

Identifizierung und Charakterisierung der Phosphodiesterasen-Isoenzyme in Bronchialepithelzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Claus Neurohr

aus

Quierschied/Saar

Gießen 1998

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II
Leiter: Prof. Dr. W. Seeger
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. N. Suttorp
Gutachter: PD Dr. A. Fischer

Tag der Disputation: 28. Juni 1999

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom des Erwachsenen
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine
hAEC	humane Atemwegsepithelzellen
H/H ⁺⁺	Hanks/Hepes-Puffer mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
HPLC	High performance liquid chromatography
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	half-maximal inhibitory concentration
LDH	Lactatdehydrogenase
pAEC	Atemwegsepithelzellen des Schweines
PDE	Phosphodiesterase
RIA	Radio Immuno Assay
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Ketten Reaktion
SEM	Standard error of the mean
SNP	Natrium-Nitroprussid
z. B.	zum Beispiel
z. Z.	zur Zeit

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Asthma bronchiale.....	1
1.3	Das Bronchialepithel.....	3
1.4	Phosphodiesterasen.....	6
1.5	Fragestellung.....	12
2.	Material und Methoden.....	13
2.1	Arbeitsstoffe und Geräte.....	13
2.2	Zellkultur.....	17
2.2.1	Atemwegsepithelzellen des Schweines (pAEC).....	17
2.2.2	Atemwegsepithelzellen des Menschen (hAEC).....	19
2.2.3	Die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B.....	20
2.2.4	Charakterisierung der Epithelzellen.....	21
2.3	Bestimmung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP.....	24
2.4	Der PDE-Assay.....	26
2.5	Statistische Methoden.....	29
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	cAMP und cGMP in Atemwegsepithelzellen.....	30
3.1.1	Toxizität von Stimuli und Inhibitoren.....	30
3.1.2	Zeitlicher Verlauf der Bildung von cAMP und cGMP in Atemwegsepithelzellen des Schweines (pAEC).....	31
3.1.3	Vergleich von Atemwegsepithelzellen des Menschen (hAEC), des Schweines (pAEC) und der Zelllinie BEAS-2B.....	34
3.1.4	IC ₅₀ für Rolipram und Zaprinast in pAEC und BEAS-2B.....	38
3.1.5	Bestimmung der intra- und extrazellulären Konzentration von cAMP und cGMP....	41
3.1.6	Einfluß von Probenicid auf cAMP und cGMP.....	47
3.2	Aktivität der PDE-Isoenzyme in Atemwegsepithelzellen.....	50

4.	Diskussion.....	53
4.1	Identifizierung der PDE-Isoenzyme in Atemwegsepithelzellen	53
4.2	Verfahren der Isoenzymmuster-Bestimmung.....	54
4.3	Atemwegsepithelzellen als Untersuchungsmaterial.....	57
4.4	Export zyklischer Nukleotide.....	59
4.5	Phosphodiesterasen als Angriffspunkte therapeutischer Interventionen.....	61
5.	Zusammenfassung.....	64
6.	Literaturverzeichnis.....	66
7.	Danksagung.....	81
8.	Lebenslauf.....	82

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Metabolismus der zyklischen Nukleotide im Bronchialepithel. Die Untersuchungen konzentrierten sich auf die Enzymgruppe der Phosphodiesterasen (PDE) und ihre Beeinflußbarkeit durch verschiedene Pharmaka. Ausgangspunkt der Überlegungen war eine geänderte Sichtweise der Rolle des Bronchialepithels im Rahmen entzündlicher Atemwegserkrankungen und ein besseres Verständnis des therapeutischen Prinzips der Methylxanthine (8, 9).

1.2 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist als anfallsweise auftretende akute Atemnot auf dem Boden einer generalisierten Obstruktion der Atemwege definiert. Typisches Merkmal ist die bronchiale Hyperreagibilität. Diese ist durch eine erhöhte Neigung der Atemwege zu Bronchospasmus, entzündlicher Schleimhautschwellung und Hypersekretion von Bronchialsekret nach Einwirkung vielfältiger exogener Reize gekennzeichnet (5). Mit einer Prävalenz von 10 % bei Kindern und 5 % bei Erwachsenen handelt es sich um eine der häufigsten chronischen pulmonalen Erkrankungen.

Ätiologisch unterscheidet man zwischen allergischen (extrinsic), nichtallergischen (intrinsic), chemisch- oder physikalisch-irritativen, anstrengungsinduzierten und pseudoallergischen Formen. Insbesondere im Erwachsenenalter auftretende Verläufe erlauben aber häufig keine eindeutige Zuordnung und manifestieren sich als sog. Mischvarianten. Während bei allergischem Asthma eine IgE-vermittelte Sofort-Reaktion (Typ I) nach Sensibilisierung durch Allergene zu Grunde liegt, ist die Ursache des intrinsischen Asthmas weitgehend ungeklärt. Allerdings gibt es Hinweise, daß virale Infekte der Bronchien eine wichtige Rolle spielen (5, 10).

Unabhängig von der Ätiologie zeigen alle Formen ein ähnliches morphologisches Korrelat. Es besteht aus einer ödematösen Schwellung der Bronchialschleimhaut mit entzündlicher

Infiltration besonders durch eosinophile Granulozyten, Mastzellen, Lymphozyten und in geringerem Ausmaß auch neutrophile polymorphkernige Granulozyten (PMN). In diesem Zusammenhang zeigt sich regelmäßig eine unterschiedlich stark ausgeprägte Schädigung des Bronchialepithels (s.u.). Diese Veränderungen sind typischerweise auch im symptomfreien Intervall der Erkrankung nachweisbar (6). Zur klinisch relevanten endobronchialen Obstruktion kommt es, wenn im Anfall ein Spasmus der glatten Bronchialmuskulatur und die Hypersekretion eines zähen Schleimes (Dyskrie) in Kombination mit einem ausgeprägten Schleimhautödem auftreten.

Ein herausragendes Charakteristikum, welches bei allen Asthmatikern auftritt, ist die bronchiale Hyperreaktivität. Sie wird als eine Folge der chronischen bronchialen Entzündung verstanden. Im anfallsfreien Intervall ergibt die normale Lungenfunktionsprüfung oft keinen Hinweis auf eine bronchiale Obstruktion. Mit Hilfe des unspezifischen Provokationstests mit Metacholin oder Histamin läßt sich dennoch das hyperreagible Bronchialsystem nachweisen. Es zeigt sich eine deutliche Atemwegswiderstandserhöhung mit Verminderung des FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) bereits bei sehr geringen Konzentrationen der Provokationssubstanz (7).

Die kausale Therapie des Asthma bronchiale ist bislang auf eine Meidung der auslösenden Noxen bzw. eine Allergenkarenz begrenzt. Nur in ausgewählten Fällen ist eine Hyposensibilisierung möglich.

Der medikamentöse Ansatz basiert auf antiinflammatorischen und bronchodilatierenden Maßnahmen. Nach einem Stufenplan kommen Mastzellstabilisatoren (u.a. Cromoglicinsäure), Anticholinergika, Glukokortikosteroide, beta-2-Sympathomimetika, Leukotrienrezeptor-Antagonisten und Methylxanthine (z.B. Theophyllin) in verschiedenen Kombinationen zur Anwendung (5).

Entzündungshemmend wirken dabei Cromoglicinsäure, Glukokortikosteroide, Leukotrienrezeptor-Antagonisten und Methylxanthine. Eine antiobstruktive Potenz weisen Anticholinergika, beta-2-Sympathomimetika, Leukotrienrezeptor-Antagonisten und Methylxanthine auf.

Demzufolge sind nur Leukotrienrezeptor-Antagonisten und Methylxanthine über beide Mechanismen wirksam (125, 126). Obwohl die Wirkungsweise noch immer nicht vollständig geklärt ist, scheint der Hauptangriffspunkt der Theophyllinderivate die Inhibition der Phosphodiesterasen zu sein (8).

1.3 Das Bronchialepithel

Traditionell wurde das Bronchialepithel in erster Linie als eine physikalische Barriere betrachtet. Seine Aufgabe schien hauptsächlich der Schutz der darunterliegenden Gewebe vor inhalierten Schadstoffen zu sein. Zahlreiche neuere Untersuchungen haben aber gezeigt, daß seine Funktionen wesentlich komplexerer Natur sind. Zur Aufrechterhaltung der Homöostase nimmt das Epithel der Atemwege an der Erregerabwehr, der mukoziliären Clearance sowie dem Elektrolyt- und Flüssigkeitstransport teil (28). Zusätzlich wirkt es regulierend an der lokalen Immunantwort und Entzündungsreaktionen mit (11). Unter diesen Aspekten wird ihm auch in der Ätiologie und Pathogenese des Asthma bronchiale zunehmend eine bedeutendere und aktive Rolle zugeschrieben (6).

Normales Atemwegsepithel

Es findet sich ein zweireihiges, hochprismatisches Flimmerepithel mit Schlagrichtung nach oral. Die Abgrenzung vom darunterliegenden Bindegewebe erfolgt durch eine Basalmembran, die hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Laminin-Entaktin/Nidogen-Komplexen und Proteoglykanen besteht (12). Häufigster Zelltyp ist die Kinozilientragende Zelle, die wie die schleimproduzierenden Becherzellen Anschluß zum Lumen hat (13). Nicht in direktem Kontakt zu den Atemwegen stehen dagegen die Basalzellen. Diese sind über Hemidesmosome mit der Basalmembran und über Desmosome mit den beiden zuvor genannten Zelltypen verbunden (14). Unmittelbare Zell-zu-Zell-Kommunikation ist über gap junctions möglich. Währenddessen gewährleisten die Zonula occludens (tight junctions) hauptsächlich die Barrierefunktion des Epithels (15, 16). Zusätzlich lassen sich die neurosekretorischen Zellen des APUD-Systems, Clara-Zellen, vereinzelt Lymphozyten und sensorische Nervenfasern nachweisen (17). In der Pathogenese des Asthmas wahrscheinlich von großer Bedeutung sind die dendritischen Zellen (11). Sie gehören zu den effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen im Atemwegsepithel und entwickeln sich, wie die Langerhans-Zellen der Epidermis, aus Monozyten (9).

Veränderungen im Rahmen des Asthma bronchiale

Histologische Untersuchungen zeigen regelmäßig eine Schädigung und Höhenabnahme des Epithels (23). Dieses wird als Desquamation bezeichnet und beschreibt insbesondere die gelockerte Verbindung der Zellen zu ihrer Basalmembran (20). Je ausgeprägter der Strukturverlust, desto relevanter ist die nachweisbare Hyperreaktivität (19). Zusätzlich imponiert eine Becherzellhyperplasie, die mit einer deutlichen Verminderung der zilientragenden Zellen einhergeht (21). Mit dieser Änderung des Gewebeaufbaus scheint die Oberfläche der Atemwege aber unspezifisch auf verschiedene Irritationen zu reagieren. Sie wird u.a. durch Zigarettenrauch (vgl. chronische Bronchitis), Gase und Allergene hervorgerufen (13).

Um die histopathologischen Besonderheiten des Asthma bronchiale zu charakterisieren, wurde auch die Bezeichnung chronische eosinophile Bronchitis verwendet (22). Man findet eine ödematöse Schwellung der Schleimhaut. Unter den infiltrierenden Zellen sind besonders die Eosinophilen stark vertreten. Aber auch Lymphozyten (bes. T-Helfer-Zellen), Mastzellen und Makrophagen lassen sich vermehrt nachweisen (24). Weitere Merkmale sind eine Verminderung der relaxierenden Vasoaktives-Intestinales-Polypeptid (VIP)-enthaltenden Nervenfasern und eine gleichzeitige Zunahme der Substanz P-aufweisenden neuralen Strukturen (25, 26). Typisch für die Asthmaerkrankung ist zusätzlich eine Verbreiterung der Basalmembran, insbesondere durch Anlagerung von Kollagen Typ III und V sowie dem extra-zellulären Matrix Protein Fibronectin (21, 27).

Die hier beschriebenen strukturellen Veränderungen sind bereits in frühen klinischen Stadien der Erkrankung erkennbar (18). Sie sind Folge einer Dysfunktion der immunmodulatorischen und entzündungsregulierenden Reaktionen des Bronchialepithels im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses (6, 41). In dessen Verlauf kommt es zur Freisetzung und Expression einer Vielzahl von Epithelzellprodukten. Eine große Anzahl unterschiedlicher Arachidonsäure-Metaboliten konnte nachgewiesen werden. Aus der Gruppe der Prostaglandine scheinen D_2 , 6-keto- $F_{1\alpha}$ und in besonderem Maße E_2 und $F_{2\alpha}$ eine Rolle zu spielen (118, 120). Neben den Leukotrienen B_4 und C_4 wurden an Lipoxygenase-Produkten vor allem 12- und 15-HETEs (Hydroxy-Eicosotetraen-Säure) gefunden (29, 30, 31). Zu der Vielzahl der gebildeten Zytokine gehören u.a. die Interleukine 1, 6 und 8, $TNF-\alpha$ (Tumor Nekrose Faktor), $TGF-\beta$ (transforming growth factor), RANTES, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) und GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) (32, 33, 34, 134, 135). Insbesondere GM-CSF ist im Epithel von Asthmatikern deutlich erhöht und scheint eine

wichtige Rolle in der Unterhaltung der Entzündung zu spielen (35, 36, 37). Desweiteren konnten mehrere Adhäsionsmoleküle identifiziert werden. Auf der Zelloberfläche beschrieben sind die α -Integrine, die an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), welches u.a. bei der Migration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten aktiv ist (38, 39). Ein zusätzlicher interessanter Befund ist die durch Stimulation mit TNF- α induzierbare NO-Synthase in Atemwegsepithelzellen (40). Das Zusammenspiel zwischen den beteiligten Geweben und ihren Produkten ist komplex und nur zum Teil verstanden. Ein Ausschnitt der bekannten Interaktionen ist in Abb. 1 am Beispiel des allergischen Asthmas dargestellt.

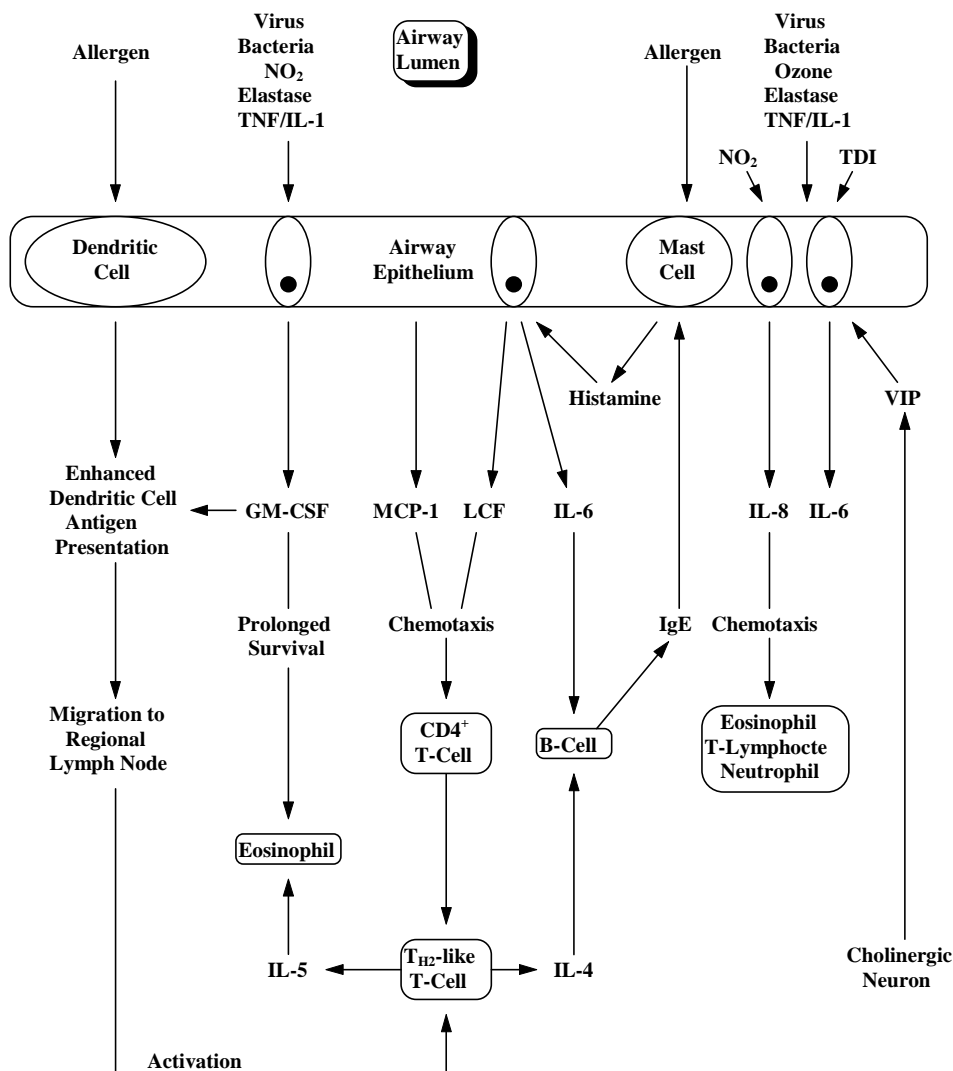


Abb. 1: Extrinsisches Asthma - Interaktionen von Atemwegsepithel und Zytokinen

LCF: lymphocyte chemoattractant factor; MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1; TDI: toluene diisocyanate; Modifiziert nach Stewart J. Levine (11).

1.4 Phosphodiesterasen

Die Regulation vieler wichtiger Stoffwechselprozesse wird durch die Bindung eines Hormons an einen spezifischen Rezeptor der Zielzelle eingeleitet. In der damit angestoßenen intrazellulären Signaltransduktionskette werden u.a. im Adenylat- bzw. Guanylatzyklasesystem die „second messenger“ Adenosin- und Guanosin-3',5'-cyclo-monophosphat (cAMP, cGMP) gebildet. Dieser Prozess läßt sich auch experimentell durch den Adenylatzyklaseaktivator Forskolin und den Guanylatzyklaseaktivator Nitroprussidnatrium (SNP) starten. Die Funktion der Phosphodiesterasen (PDE) der zyklischen Nukleotide ist die spezifische Inaktivierung von cAMP und cGMP durch Hydrolyse ihrer 3'-Phosphoester-Bindungen (Abb. 2). Die Existenz des PDE-Systems zur Katalyse des Abbaus zyklischer Nukleotide zu nicht-zyklischem AMP und GMP wurde als deutlicher Hinweis auf die physiologische Relevanz dieser Substanzen gewertet. Als Hauptfunktion der Phosphodiesterasen wird folgerichtig die Modulation des „second messenger“-Signals der Moleküle cAMP und cGMP angesehen.

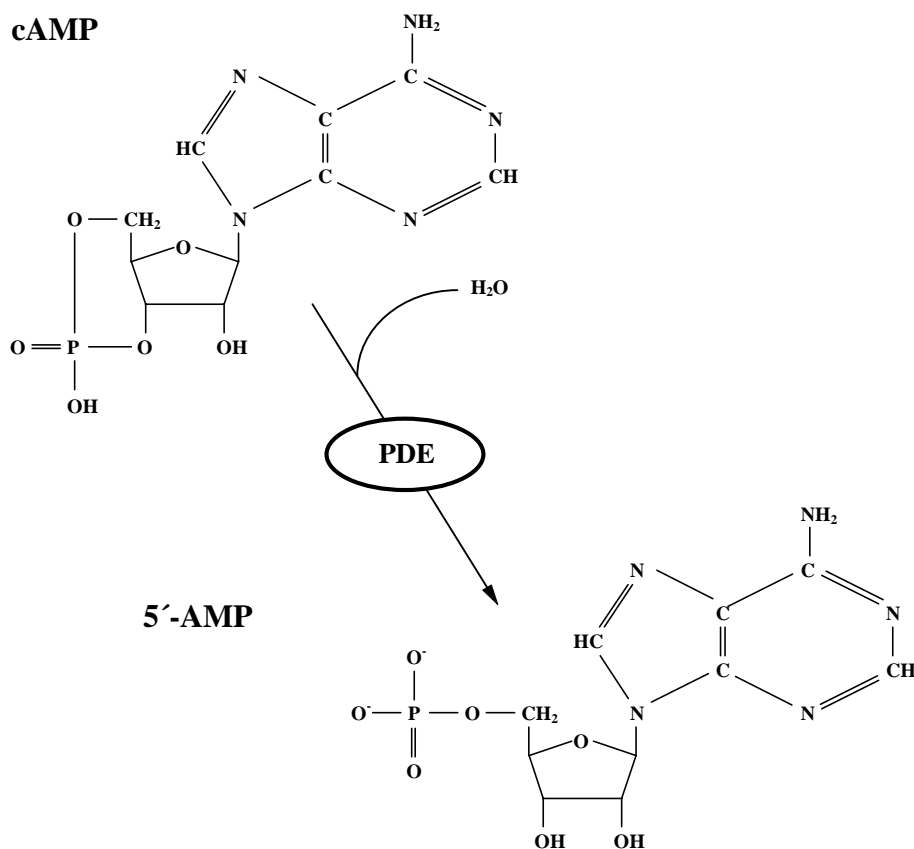


Abb. 2: Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP durch Phosphodiesterasen

Abbau von cAMP durch PDE's zu nicht zyklischem Adenosin-5'-Monophosphat (43).

Aufbau der Phosphodiesterasen

Die Reinigung und Charakterisierung von Phosphodiesterasen der zyklischen Nukleotide (PDE) wurde erstmalig von Butcher und Sutherland 1962 beschrieben (42). Alle näher untersuchten Säugetier-PDE zeigen große strukturelle Ähnlichkeiten. Sie besitzen einen zentralen Abschnitt mit einer Homologie von mehr als 60 Prozent zwischen den Isoenzym-Familien. Diese hochkonservierte Folge von ca. 270 Aminosäuren bildet das katalytische Zentrum des Enzyms (44).

Über sog. Scharnierregionen ('hinge regions') ist dieser Teil mit den carboxyl- und aminoterminalen Bereichen verbunden. Sie weisen nur geringe Sequenz-Übereinstimmungen beim Vergleich der PDE-Familien auf (44). Die Variabilität und der Nachweis verschiedener Bindungsstellen in diesen Abschnitten lassen vermuten, daß es sich um die regulatorischen Domänen des Proteins handelt (45, 46). In der aminoterminalen Region sind insbesondere die Fähigkeit zur Insertion an die Plasmamembran und die Festlegung der subzellulären Lokalisation determiniert (47). Auch die Existenz einer Rolipram-Bindungsstelle in PDE4 und Phosphorylierungsregionen der Phosphodiesterasen, die selbst als Substrat von Proteinkinasen dienen, sind bekannt (48, 49).

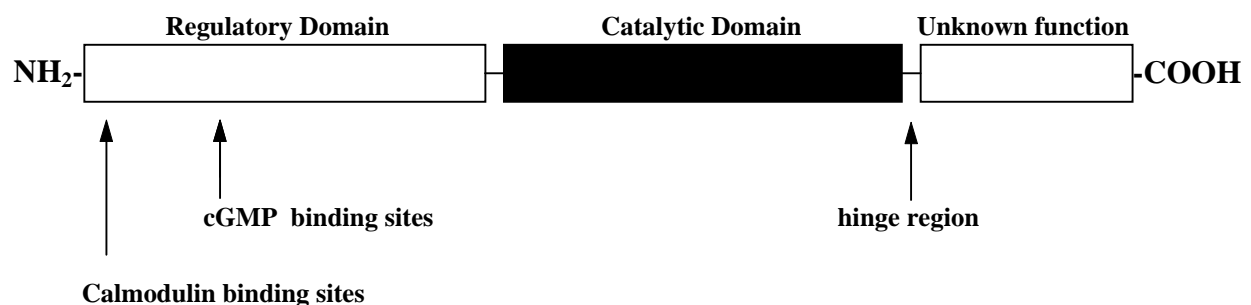


Abb. 3: Schematische Darstellung der PDE-Primärstruktur

Hochkonserviertes katalytisches Zentrum und heterologe carboxyl- und aminoterminalen Regionen mit regulatorischen Funktionen verbunden durch sog. Scharnierabschnitte (hinge regions). Modifiziert nach Conti et al (44).

Klassifikation und Nomenklatur der Phosphodiesterasen

Die Einteilung der PDE basiert auf der Sequenzierung der primären Proteinstruktur und der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA). Zusätzlich werden Parameter wie Substratspezifität und Regulationmechanismen berücksichtigt (50).

Zur Zeit sind sieben Phosphodiesterasen-Genfamilien mit mehr als 25 verschiedenen PDEs bekannt. Innerhalb der Isoenzymgruppen besteht eine Homologie von mehr als 65 Prozent. Im Vergleich untereinander sinkt der übereinstimmende Anteil dagegen auf weniger als 40 Prozent (45). Bisher hat jede genauere Untersuchung einer Familie zum Nachweis von mehr als einem Genprodukt geführt. Durch Anwendung neuerer molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, daß von den meisten dieser PDE-Gene mehrere mRNA (Boten-Ribonukleinsäuren) alternativ transkribiert werden. Das Auftreten verschiedener Isoenzyme und Splicing Varianten scheint gewebe-, zell- und z.T. speziesspezifisch zu sein. Die unterschiedliche Expression der PDE-Genprodukte hat wahrscheinlich auch Konsequenzen für die funktionellen Prozesse und deren Beeinflußbarkeit. Allerdings ist eine Mehrzahl der 'neuen' Phosphodiesterasen nur ihrer Nukleotidstruktur nach bekannt. Daten über die Kinetik und die Regulation dieser Enzyme liegen nur zu einem geringen Teil vor (52). Abbildung 4 zeigt die aktuelle PDE-Nomenklatur wie sie im Human Genome Project verwendet wird (51).

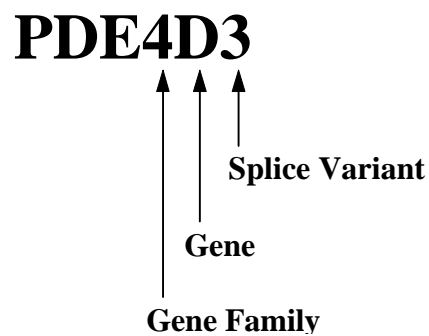


Abb. 4: Nomenklatur der PDE

Die ersten drei Buchstaben und eine arabische Ziffer bezeichnen die PDE-Genfamilie. Der folgende Buchstabe steht für das individuelle Genprodukt innerhalb der Familie. Die letzte Ziffer codiert die Splice Variante in der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Beavo et al (51).

Die PDE-Genfamilien

Bisher sind sieben PDE-Familien bekannt; zwei weitere werden diskutiert, ohne daß ihre Identität z. Z. als gesichert gilt (133).

Die bekannten PDE-Familien werden kurz charakterisiert sowie wichtige Eigenschaften wie Substratspezifität, Regulationsmechanismen und physiologische Funktionen aufgezeigt. Die genannten Inhibitoren sind unter Berücksichtigung ihrer IC_{50} -Werte (half-maximal inhibitory concentration) als selektiv für ihre PDE-Isoenzymfamilien anzusehen. Bekannte nicht-selektive Substanzen sind das seit langem in der Asthmatherapie eingesetzte Theophyllin (IC_{50} 50-300 μ M) und IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin, IC_{50} 2-50 μ M) (42). Der exakte IC_{50} -Wert variiert in Abhängigkeit von den untersuchten Präparationen und den jeweils betrachteten Isoenzymen.

PDE1

Die PDE1-Familie setzt sich aus drei Genen mit jeweils mindestens drei Varianten zusammen (53, 54). Die Substratspezifität ist uneinheitlich. Bei den näher untersuchten Formen wurden aber für cGMP jeweils die niedrigeren Michaelis-Konstanten (K_m) nachgewiesen (55). Die Genprodukte benötigen für ihre enzymatische Aktivität Kalzium und Kalmodulin (sog. Ca^{2+} /CaM-abhängige PDE) (52). Auch die Regulation durch Phosphorylierung /Dephosphorylierung ist beschrieben (56). Die Hauptbedeutung der Ca^{2+} /CaM-abhängigen PDEs liegt in der Koordination von Signaltransduktionswegen, die sowohl über Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration als auch des Levels an zyklischen Nukleotiden arbeiten. Der Inhibitor Vinpocetin (IC_{50} 20 μ M) wurde in klinischen Studien als Nootropikum getestet (57).

PDE2

Ein Gen mit zwei Varianten ist bisher dieser Familie zugeordnet (58). Die K_m -Werte für die Hydrolyse von cAMP und cGMP bewegen sich in vergleichbaren Größenordnungen. Typisches Merkmal dieser Familie ist die Existenz einer nicht-katalytischen, hochspezifischen Bindungsstelle für cGMP. Wenn diese besetzt ist, zeigt sich ein deutlicher Anstieg der

enzymatischen Aktivität (sog. cGMP-stimulierte PDE). Tierexperimentell konnte die Bedeutung für die Kontrolle von Kalzium-Kanälen in Myozyten nachgewiesen werden (59). Desweiteren wird u. a. hemmende Wirkung von ANP (atriales natriuretisches Peptid) auf die Aldosteron-Synthese über PDE2 vermittelt (60). Auch die im Verlauf von Entzündungsreaktionen typischerweise erhöhte endotheliale Permeabilität läßt sich durch eine Hemmung der PDE2 reduzieren (117). Als selektiver Inhibitor steht EHNA zur Verfügung (IC_{50} 1.0 μ M). Allerdings wird durch ihn auch die Adenosindeaminase gehemmt (61).

PDE3

Diese Familie besteht bisher aus zwei Genen mit zwei bzw. einer Variante. Als Substrat wird hauptsächlich cAMP umgesetzt. Bei Bindung von cGMP, die mit hoher Affinität eingegangen wird, kommt es zu einem starken Abfall der Aktivität (sog. cGMP-inhibierte PDE) (62). Eine Steigerung der Hydrolyse wird durch cAMP- oder Insulin-abhängige Proteinkinasen bewirkt (65, 66). Die PDE3-Familie hat u. a. wichtige Funktionen im Rahmen der Thrombozyten-Aggregation, der Blutdruckregulation und der kardialen Kontraktilität (63, 64). Aufgrund ihrer positiv inotropen und vasodilatierenden Wirkung werden PDE3-Inhibitoren wie Enoximon (IC_{50} 1.0 μ M) bereits zur Kurzzeittherapie der schweren Herzinsuffizienz (NYHA IV) eingesetzt (67).

PDE4

Mit jeweils mindestens zwei Varianten aus vier Genen handelt es sich um die größte PDE-Familie. Diese Enzymgruppe ist hochspezifisch für cAMP und durch cGMP weitgehend unbeeinflußbar (sog. cAMP-spezifische PDE) (68). Die Regulation erfolgt soweit bekannt auf der Transkriptionsebene und über cAMP-abhängige Phosphorylierung (69, 70). Genprodukte dieser Gruppe wurden insbesondere in allen Entzündungszellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse nachgewiesen (71). Während früher der selektive PDE4-Inhibitor Rolipram (IC_{50} 2.0 μ M) besonders als Antidepressivum interessierte, wird er in neueren Studien auf seine entzündungshemmende Potenz hin untersucht (72, 73).

PDE5

Ein Gen mit mindestens zwei Varianten ist identifiziert. Diese Familie weist eine hohe Substratspezifität für cGMP auf, besitzt aber zusätzlich nicht-katalytische cGMP-Bindungsstellen (sog. cGMP-spezifische PDE). Die Aktivierung des Enzyms kann über cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen erfolgen (74). Die katalytische Fähigkeit der PDE5 ist auf die Anwesenheit von Zn^{2+} angewiesen (52). Inwieweit dies ein Merkmal aller Phosphodiesterasen darstellt, ist noch unklar. Die Regulation der Natrium und Wasserausscheidung sowie Reduktion des pulmonalen Gefäßwiderstandes sind als physiologische Funktionen dieser PDE-Familie bekannt (75, 76). Für Inhibitoren wie Zaprinast (IC_{50} 0.76 μ M) wurden positive Effekte auf die pulmonale Hypertonie gezeigt (77).

PDE6

Aufgrund der Substratspezifität für cGMP und der ebenfalls vorhandenen nicht-katalytischen cGMP-Bindungsstellen wurden diese Enzyme zunächst als Teil der PDE5-Familie gesehen. Wegen der unterschiedlichen Proteinprimärstruktur und ihrer ausschließlichen Lokalisation in der Retina wurden sie in die aktuelle Nomenklatur aber als eigenständige Familie mit bisher drei Genen und mehreren Varianten aufgenommen (sog. cGMP-spezifische Photorezeptor-PDE) (78). Die physiologische Funktion dieser Enzymgruppe liegt in der Phototransduktion. Sie wirken bei der Regulation von cGMP-gesteuerten Kationenkanälen in der Membran von Stäbchen und Zapfen mit (79). PDE6-Mutationen sind wahrscheinlich Ursache der autosomal-dominanten kongenitalen Nachtblindheit und der autosomal-rezessiven Retinitis pigmentosa (80). Als Inhibitor wird Zaprinast (IC_{50} 0.15 μ M) benutzt (77).

PDE7

Diese Familie besteht zur Zeit aus einem Gen mit zwei Varianten. Charakteristika sind die hohe cAMP-Substratspezifität und die fehlende Beeinflussbarkeit durch PDE4-Inhibitoren wie Rolipram (sog. cAMP-spezifische Rolipram-insensitive PDE) (78). Über die physiologische Bedeutung ist bisher wenig bekannt. Auf der cDNA- und mRNA-Ebene konnte der Nachweis

in Skelettmuskelzellen, T-Lymphozyten und Endothelzellen erbracht werden (81). Einige Autoren vermuten, daß die antiinflammatorische Wirkung von Methylxanthinen bei allergischem Asthma z. T. auf der PDE7-Inhibition in immunkompetenten Zellen beruht (82). Selektive Inhibitoren sind aber für diese Familie bis dato nicht identifiziert worden.

1.5 Fragestellung

Mit den bisher gemachten Ausführungen wurde versucht, einen Überblick über die komplexen Funktionen des Bronchialepithels und die sich explosionsartig vermehrenden Kenntnisse der Phosphodiesterasen zu geben. Folgende Überlegungen werden dadurch nachvollziehbar.

Im Rahmen entzündlicher Atemwegserkrankungen muß das Bronchialepithel verstärkt als sinnvoller Angriffspunkt therapeutischer Bemühungen gesehen werden. Inwieweit die in der Asthmabehandlung bereits eingesetzten Medikamente ihre Wirkung auch durch Beeinflussung des Epithels erreichen, ist noch nicht geklärt. Für die antiinflammatorischen Pharmaka scheint dies aber zumindest teilweise wahrscheinlich. Die in der Behandlung des Asthma bronchiale etablierte Medikation mit Methylxanthinen (z. B. Theophyllin) hat sich bewährt, ist aber aufgrund der geringen therapeutischen Breite und der Nebenwirkungen nicht unproblematisch. Daher könnte die Anwendung selektiver PDE-Inhibitoren ein sinnvoller Schritt zur Optimierung des Behandlungserfolges sein.

Um einen Zugang zu der Problematik zu gewinnen, erscheint es naheliegend, das Epithel der Atemwege zunächst isoliert zu betrachten und die Phosphodiesterase-Enzymaktivitäten zu analysieren.

In der vorliegenden Promotionsschrift wurden folgende Fragen im Einzelnen bearbeitet:

1. Wie lassen sich in intakten Bronchialepithelzellen die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP durch selektive PDE-Inhibitoren beeinflussen ?
2. Welche Aktivitäten von Isoenzymen der Phosphodiesterasen können im Lysat von Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden ?

2. Material und Methoden

2.1 Arbeitsstoffe und Geräte

Immunzytologie

- Anti-Cytokeratin MNF 116 (Maus IgG), Dakopatts (Hamburg, Deutschland)
- Anti-Vimentin V9 (Maus IgG), Dianova-Immunotech (Hamburg, Deutschland)
- Avidin/Biotin-Blockierungs-Kit, Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- Hämalalaun, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Kaiser's Glycerin Gelatine, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Anti-Maus-Antikörper (Pferd IgG), biotiniliert, Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- p-Nitrophenylphosphat, Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- PBS (phosphate-buffered saline), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Trispuffer, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Vectastain ABC-alkalische Phosphatase Kit, Vector Laboratories (Burlingame, USA)

Inhibitoren und Stimuli

- 4-(3'-Cyclopentyloxy-4'-Methoxyphenyl)-2-Pyrrolidon (Rolipram), Schering (Berlin, Deutschland)
- 4,5-Dihydro-6-(4-(1H-Imidazol-1-yl)-2-thienyl)-5-Methyl-3-(2H)-Pyridazinon (Motapizon), Rhone-Poulenc Rorer (Köln, Deutschland)
- Erythro-9-(2-Hydroxy-3-Nonyl)-Adenin (EHNA, MEP-1), Dr. Podzuweit, Max-Planck-Institut für experimentelle Kardiologie (Bad Nauheim, Deutschland)
- Forskolin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), , Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Nitroprussidnatrium (SNP), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Probenicid, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

- 2-O-Propoxyphenyl-8-Azapurin-6-one (Zaprinast), Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
- Vinpocetin, Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)

Inkubationsmedien

- Amphotericin B (Antimykotikum), Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Apo-Transferrin bovine, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Bovine pituitary extract (BPE), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Bovine serum albumin (BSA), fettsäure-, nuklease- und proteasefrei, Calbiochem (La Jolla, USA)
- Desoxyribonuklease (DNase) Grad II, Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Dulbeco's MEM NUT mix F-12 (DMEM/F12), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Epidermal growth factor (EGF), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Epinephrin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (FCS), Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Fibronectin, Behring (Marburg, Deutschland)
- Hank's Buffered Salt Solution ohne Phenolrot, mit Kalzium und Magnesium (H^{++}), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Hank's Buffered Salt Solution ohne Phenolrot, Kalzium und Magnesium (H^{--}), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Insulin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Keratinozyten serumfreies Medium, Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- LDH-Kit MPR1, Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- L-Glutamin, Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Medium 199 mit Earl's Salzen, Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Newborn calf serum (NBCS), Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Penicillin-Streptomycin, Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Protease Typ XIV von Streptomyces griseus, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Retinolsäure, Biofluids (Rockville, USA)
- Thyrotardin-inject, Henning (Berlin, Deutschland)

- Trypan blau, 0.5 % in NaCl 0.9 %, Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Trypsin-EDTA, Gibco (Eggenstein, Deutschland)
- Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (SBTI), Boehringer (Mannheim, Deutschland)
- Vitronektin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Kulturgefäße

- 8-Kammer Lab-Tek Chamber slide, Nunc (Kamstrup, Dänemark)
- Multischalen, 24 oder 96 Vertiefungen, Nunc (Kamstrup, Dänemark)
- T-75-Zellkulturflaschen, 260 ml, 83 cm², Nunc (Kamstrup, Dänemark)
- Filtereinsätze, 25 mm, 0.2 µm Poren, Anopormembran, Nunc (Kamstrup, Dänemark)

Lösungsmittel

- Aqua tridestillata - im Milli Q Wasseraufbereitungssystem, Millipore (Eschborn, Deutschland) entionisiert und gefiltert
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol pro analysi, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure pro analysi (100 %), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Methanol, Fluka (Schweiz)

PDE-Assay

- Ammonium-Formiat, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Benzamidin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- cAMP und cGMP, nicht radioaktivmarkiert, Calbiochem (La Jolla, USA)
- Crotalus atrox-Toxin (5'-Nucleotidase), Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Ethylenglykol-bis-(2-Amino-Ethyläther)-N,N-Tetraessigsäure (EGTA), Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Deutschland)
- [8-³H]-cAMP, 20 -30 Ci/mmol, Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland)

- [8-³H]-cGMP, 5-25 Ci/mmol, Amersham Buchler (Braunschweig, Deutschland)
- Leupeptin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Pepstatin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Protein-Assay, BioRad, (Richmond, USA)
- Dithiothreitol, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Calmodulin, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- QAE-Sephadex A-25 Säulen, BioRad, (Richmond, USA)
- Quickszint 212-Szintillator, Zinser (Frankfurt a. M., Deutschland)

cAMP- und cGMP-RIA

- Assay System RPA 509 cAMP [¹²⁵J], Amersham Buchler, (Braunschweig, Deutschland)
- Assay System RPA 525 cGMP [¹²⁵J], Amersham Buchler, (Braunschweig, Deutschland)

Geräte

- Beta-Zähler 1900 TR Liquid Scintillation Analyzer, Canberra Packard (USA)
- Gamma-Zähler Cobra, Canberra Packard (USA)
- Inkubator, Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Laminar air flow hood (Sterilbank), Gelaire (Mailand, Italien)
- Mikroskop OM-2, Olympus (Deutschland)
- Photometer Uvikon 860, Kontron instruments
- Ultraschallgerät SONOREX, Bandelin (Berlin, Deutschland)
- Zentrifuge Rotanta RPC, Hettich (Tuttlingen, Deutschland)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Atemwegsepithelzellen des Schweines

(porcine airway epithelial cells, pAEC)

Präparation und Isolation

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Atemwegsepithelzellen dienten vollständige Tracheae und Zentralbronchi von frisch geschlachteten Schweinen. Sie wurden vom Schlachthof Gießen nach Passieren der veterinärmedizinischen Kontrolle zur Verfügung gestellt. Die hier beschriebene Gewinnung der Epithelzellen lehnt sich, mit wenigen Modifikationen an eine von Wu et al. etablierte Vorgehensweise an (1). Während des Transportes und zwischen den folgenden Arbeitsschritten erfolgte die Lagerung bei +4°C. Um weitgehende Keimfreiheit zu erreichen, wurden Präparation und Isolation unter einem „laminar air flow hood“ (Sterilbank) durchgeführt und sterilisierte Einwegmaterialien verwendet.

Überflüssige Gewebereste mußten mit Skalpell entfernt und die Innenwand des Trachea-Bronchi-Abschnittes mehrmalig mit sterilfiltriertem H/H ++ gespült werden, wobei mit Blut und Schleim kontaminiertes Material zu verwerfen war. Es folgte das Einfüllen des proteasehaltigen Verdaumediums und beidseitiger Verschluß der Präparate mit chirurgischen Klemmen. Es schloß sich eine Inkubation für 16 Stunden bei +4°C unter Sicherstellung einer ausreichenden Befeuchtung an.

Aus dem so vorbereiteten Material wurde das Verdaumedium wieder entfernt und durch Isolationsmedium ersetzt. Durch vorsichtiges Massieren des verschlossenen Trachea-Bronchus-Präparates konnten die Epithelzellen in Suspension gebracht und dann das Isolationsmedium mit Pasteur-Pipetten in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Gewinnung des Zellmaterials erfolgte durch Zentrifugieren für 12 Minuten bei +4°C und 200 g; anschließend wurde der Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert.

Die Anzahl der isolierten Zellen wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und ihre Vitalität mit Hilfe von Trypan blau (0.4 %) kontrolliert. Mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/cm² erfolgte dann das Auspflanzen auf mit Kollagen vorbehandelte T-75-Zellkulturflaschen, 24-Wellplatten oder chamber slides (8-Kammer-Objektträger).

Die Zellen wuchsen in einem Inkubator mit einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Raumluft bei 37° C, wobei jeden 2. Tag ein Wechsel des Kulturmediums stattfand. Unter diesen Bedingungen standen primär isolierte, konfluente Epithelzellen nach 7-10 Tagen für Experimente zur Verfügung.

Die oben genannten Medien wurden vor ihrer Verwendung jeweils steril filtriert und hatten folgende Zusammensetzung.

Verdaumedium

DMEM/F12 mit 0.1 % Protease XIV, 0.001 % DNase, 200 IE Penicillin, 0.2 mg/ml Streptomycin und 10 µg/ml Amphotericin B.

Isolationsmedium

M 199 mit 0.2 % DNase, 200 IE Penicillin, 10 µg/ml Amphotericin B und 20 % NBCS.

Kulturmedium für pAEC

DMEM/F12 mit 100 IE Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Amphotericin B, 1 % FCS, 0.1 mg/ml L-Glutamin, 5 µg/ml BPE (bovine pituitary extract), 5 ng/ml EGF (epidermal growth factor), 5 µg/ml Transferrin, 5 µg/ml Insulin, 0.1 pg/ml Retinolsäure und 20 ng/ml T3 (Tri-Jod-Thyronin).

Kollagen-Isolation

Die Kulturgefäße wurden mit selbstisoliertem Kollagen vorbehandelt. Als Ausgangsmaterial dienten Schweineschwänze, die ebenfalls vom Schlachthof Gießen zur Verfügung gestellt wurden. Dieses Verfahren orientierte sich an einem von Doyle et al. ursprünglich für

Rattenschwänze entwickeltem Protokoll (2). Alle beschriebenen Arbeitsschritte fanden unter einer Sterilbank statt.

Die Schweineschwänze wurden für ca. drei Stunden in 70 % Ethanol inkubiert. Dann wurde die Haut abpräpariert und die längsverlaufenden Kollagenfasern konnten isoliert werden. Das gewonnene Material mußte mit einer Schere zerkleinert und ca. eine weitere Stunde mit 70 % Ethanol behandelt werden. Auf sorgfältiges Spülen mit Aqua dest. folgte ein Rührvorgang von 5 Tagen bei +4°C mit 1 g Fasermaterial je 100 ml 0.2 % Essigsäure. Es schloß sich ein Zentrifugationsschritt von 30 Minuten bei 10000 g an. Der Überstand enthielt Kollagen in einer Konzentration von 10 µg/ml und konnte bei +4°C aufbewahrt werden.

Die Kulturgefäße wurden mit 0.1 µg Kollagen je cm² vorbehandelt, wobei vor dem Bepflanzen drei bis vier Stunden gewartet werden mußte.

2.2.2 Atemwegsepithelzellen des Menschen

(human airway epithelial cells, hAEC)

Die Abteilung für Pathologie der Universität Gießen überließ uns freundlicherweise vollständige humane Tracheae und Zentralbronchi aus ihrem Sektionsgut. Es wurde nur Material von Patienten verwendet, die keine Erkrankungen der Atemwege aufwiesen und nicht endotracheal intubiert waren. Auch bei einem Zurückliegen des Todeszeitpunktes länger als 12 Stunden verzichteten wir auf eine Entnahme.

Der Ablauf der Präparation und Isolation erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie unter 2.2.1 für Atemwegsepithelzellen des Schweines beschrieben. Allerdings zeigte sich, daß für eine ausreichende Zellausbeute eine Inkubation von bis zu 20 Stunden mit dem proteasehaltigen Verdaumedium notwendig war.

Im Regelfall konnten nach ca. acht Tagen die primär isolierten und konfluenten Epithelzellen in den entsprechenden Experimenten eingesetzt werden.

2.2.3 Die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B

Die Zelllinie BEAS-2B stellte uns großzügigerweise Dr. Curtis Harris, NIH, Bethesda, Maryland, USA zur Verfügung. Es handelte sich dabei um humane Bronchialepithelzellen, die durch Infektion mit Adenovirus-12 SV 40 Hybrid Viren transformiert worden waren (3).

Diese diploiden Zellen konnten subkultiviert („gesplittet“) werden und zeigten eine kontinuierliche Wachstumstendenz für länger als ein Jahr. Trotz der bekannten genetischen Veränderungen boten sie die typische Morphologie von Epithelzellen, waren in der immunzytologischen Untersuchung Cytokeratin positiv und produzierten Mucin.

Subkultivierung („Splitten“) der BEAS-2B

Um das Zellmaterial für die Untersuchungen zu gewährleisten, mußten die Zellen subkultiviert, d.h. in eine weitere Passage überführt werden. Die hierzu nötigen Arbeitsschritte fanden unter einer Sterilbank statt.

Die zur Passagierung bestimmten Zellen wuchsen in T-75-Zellkulturflaschen. Nach Entfernen des Kulturmediums und Spülen mit H/H ++ wurden sie für 5 bis 10 Minuten mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (80 µg/ml Trypsin) bei 37°C inkubiert. Durch Zusatz von Kulturmedium entstand eine Zellsuspension, die bei +4°C mit 110 g für 12 Minuten zentrifugieren war. Der Überstand konnte verworfen und die gewonnen Zellen in 200 µl Sojabohnen-Trypsininhibitor (30 mg/ml) für 2 Minuten resuspendiert werden.

Die BEAS-2B wurden in Kulturmedium überführt und im Verhältnis 1:3 auf neue, mit Coating-Lösung vorbehandelte Kulturgefäße aufgeteilt. Das Wachstum erfolgte in einem Inkubator in 5 % CO₂ und 95 % Raumluft bei 37°C mit einem Mediumwechsel nach jeweils drei Tagen. Auf diese Weise zeigten sich nach durchschnittlich acht Tagen konfluente Zellen.

Kulturmedium für BEAS-2B

Serumfreies Keratinocytenmedium mit 100 IE/ml Penicillin, 0.1 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Amphotericin B, 0.1 pg/ml Retinolsäure, 5 µg/ml BPE (bovine pituitary extract), 5 ng/ml EGF (epidermal growth factor), 0.5 µg/ml Epinephrin und 0.1 mg/ml L-Glutamin.

Coating-Lösung

Die Kulturgefäße wurden vor dem Bepflanzen für mindestens 30 Minuten mit einer Coating-Lösung behandelt. Sie setzte sich zusammen aus M 199 mit 0.01 % BSA, 50 µg/ml Vitronectin und 10 µg/ml Fibronectin.

2.2.4 Charakterisierung der Epithelzellen

Zur Charakterisierung der primär isolierten Atemwegsepithelzellen fanden morphologische und immunzytochemische Kriterien Anwendung.

Zellmorphologie

Bei Betrachtung im Lichtmikroskop waren die für Epithel typischen polygonalen Zellformen mit regelmäßig nachweisbarem Zilienschlag deutlich zu erkennen. Von Tracheae und Zentralbronchi nach Einwirkung des Verdaumediums angefertigte Schnitte zeigen die auf die Epithelschicht begrenzte Ablösung der Zellen und die erhaltene Integrität der Basalmembran (Abb. 5 a und b).

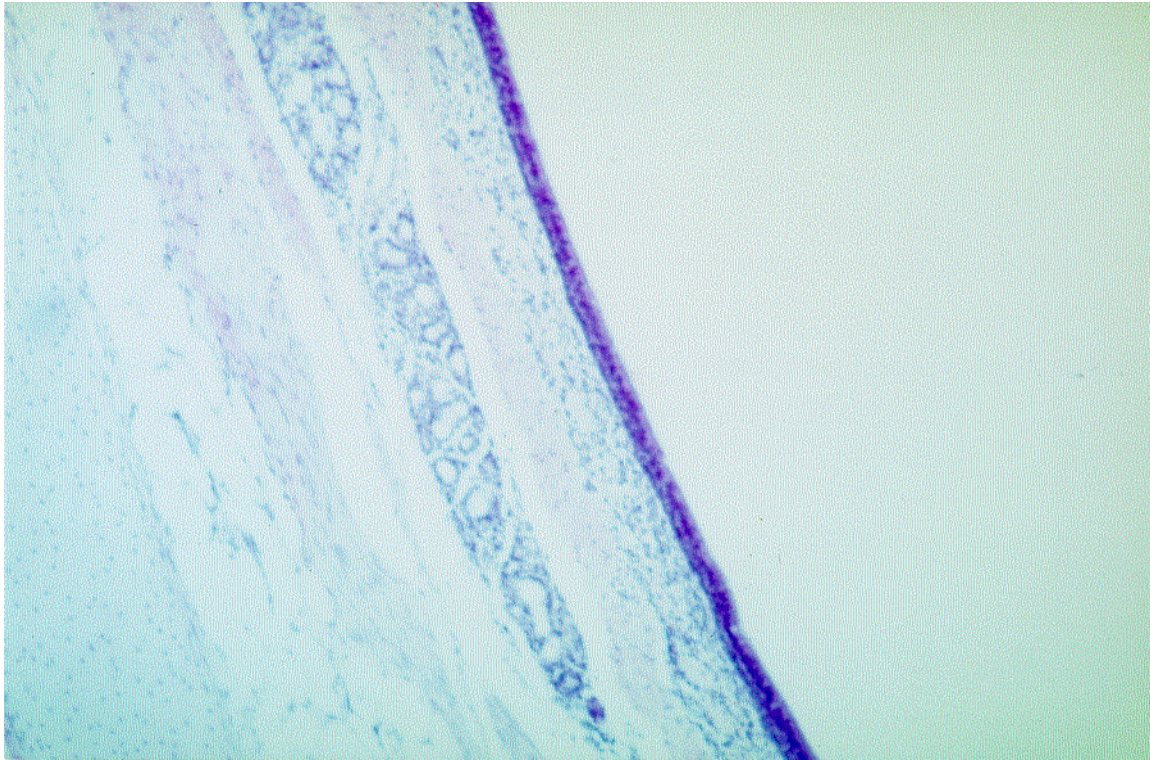


Abb. 5 a: unbehandelter Trachea-Querschnitt

Vergrößerung 10-fach, Schwein

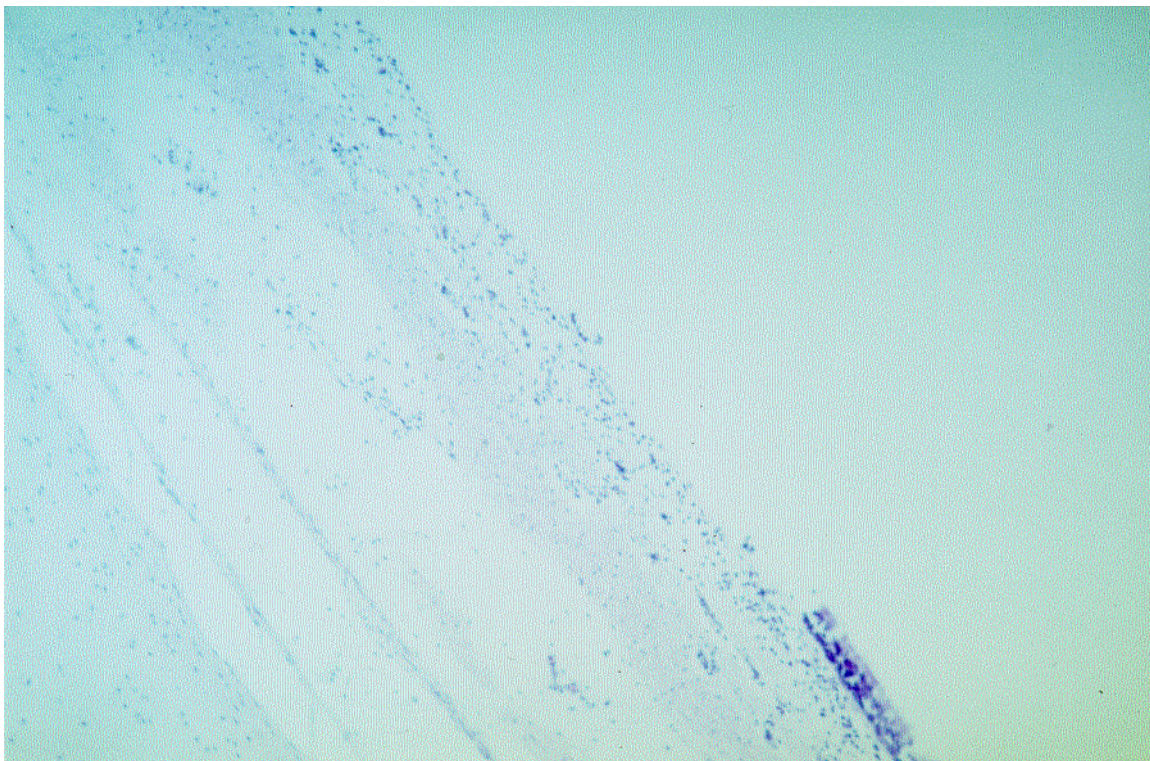


Abb. 5 b: Trachea-Querschnitt nach Inkubation mit Verdaumedium für 15 h

Vergrößerung 10-fach, Schwein. Ablösung der Epithelzellschicht bei intakter Basalmembran.

Immunzytologie

Mit Hilfe immunzytochemischer Methoden zur Untersuchung des Zytoskelettes konnte das für Epithelzellen typische Zytokeratin nachgewiesen und das Fehlen von Vimentin gezeigt werden (Abb. 6 a und b) (127, 128). Der Anteil der Epithelzellen in der Kultur lag bei größer 95 Prozent. Es wurden konfluente, auf chamber slides gewachsene Zellen verwendet. Nach sorgfältigem Spülen erfolgte eine Permeabilisierung und Fixation durch ein Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) bei -20°C für 5 Minuten. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde eine Absättigung durch PBS mit 0.1 % Pferdeserum und einer Avidin-Biotin-Blockierungslösung durchgeführt. Es schloß sich die Gabe des Maus-Antizytokeratin bzw. -Antivimentin-Antikörpers an. Überschüssiger erster Antikörper mußte vorsichtig entfernt und dann der zweite, ein gegen Maus-IgG gerichteter, biotinilierter Antikörper zugesetzt werden. Dessen Markierung wurde mit der ABC-Lösung (Avidin DH + biotinilierte alkalische Phosphatase) vorgenommen. Die Sichtbarmachung der Bindungsstellen erfolgte durch eine Farbreaktion mit p-Nitrophenylphosphat. Als letzte Schritte schlossen sich eine Kernfärbung mit Hämalaun und das Einbetten in Kaiser's Glycerin an.

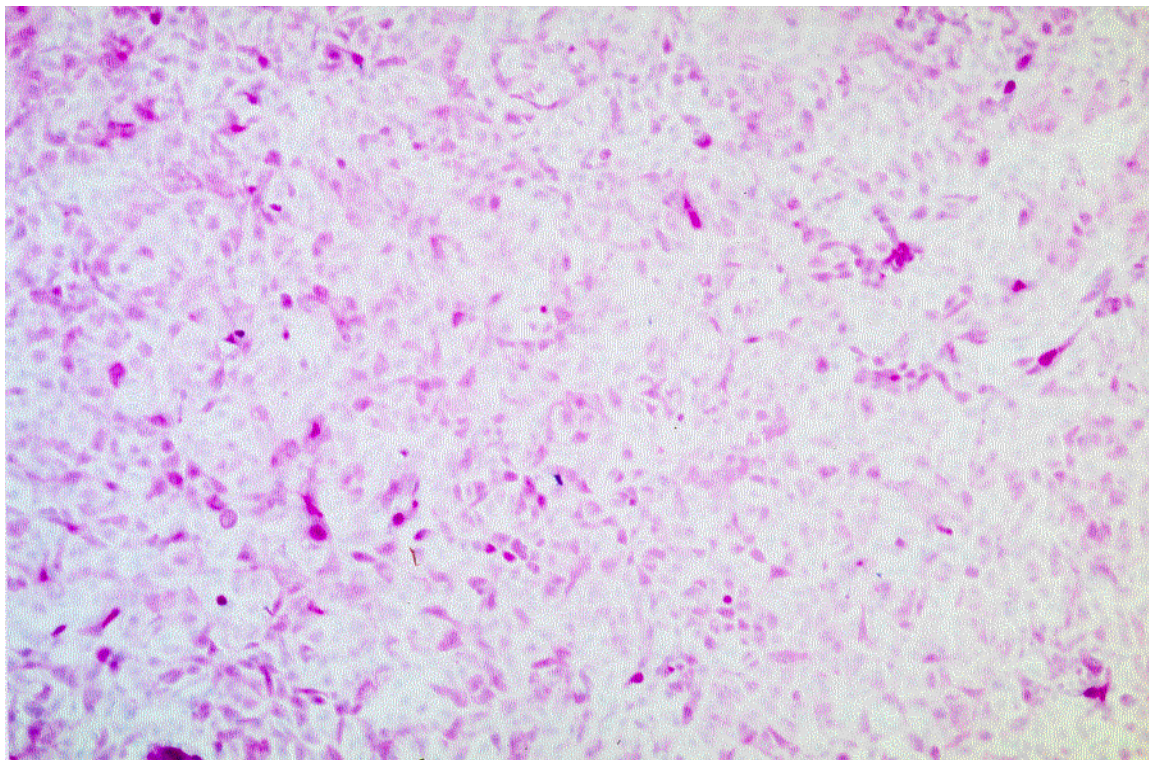


Abb. 6 a: pAEC: Zytokeratin 1: 500, Vergrößerung 10-fach

Deutliche Rotfärbung der Epithelzellen bei stark positiver Bindungsreaktion des Antizytokeratin-Antikörpers.

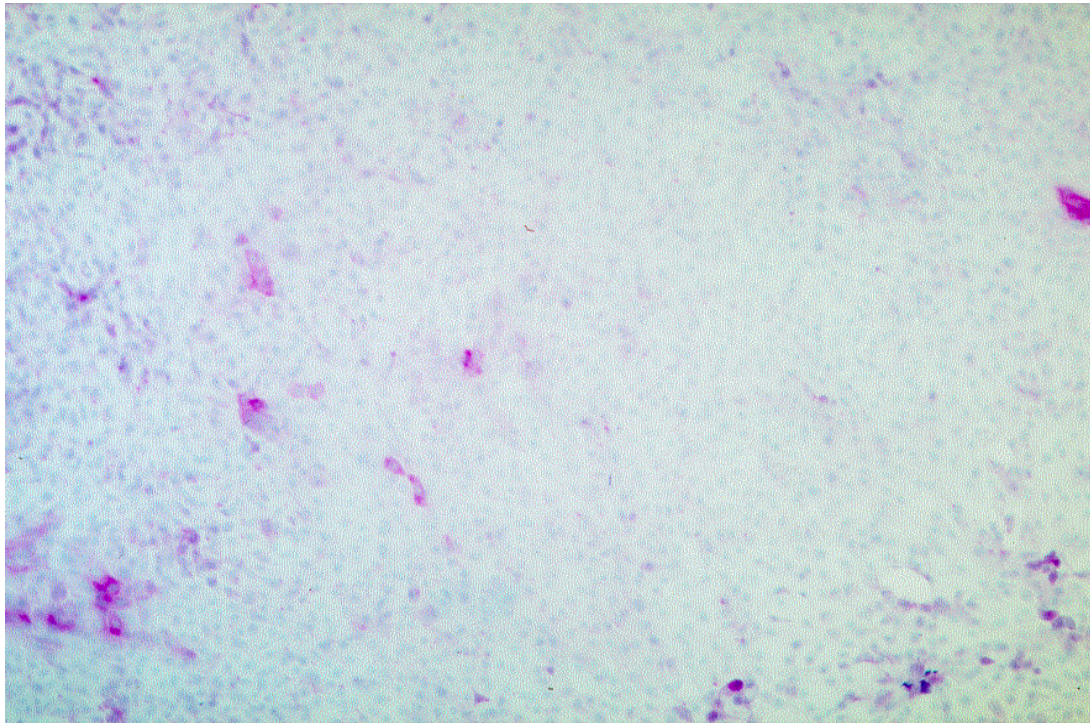


Abb. 6 b: pAEC: Vimentin 1:50, Vergrößerung 10-fach

Keine Anfärbung der Epithelzellen bei fehlender Bindungsreaktion des Antivimentin-Antikörpers.

2.3 Bestimmung der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP

Zur Detektion von cAMP und cGMP wurde ein Radio Immuno Assay (RIA) der Firma Amersham verwendet. Diese Methode erlaubte die Bestimmung von cAMP und cGMP mit einem Auflösungsvermögen von 2-256 fmol/100 µl Probe. Das Prinzip des RIA sei im folgenden am Beispiel der cAMP-Bestimmung erläutert.

Das in der Probe zu bestimmende cAMP konkurriert mit einer definierten, zugeführten [¹²⁵J]-markierten Menge von cAMP um einen cAMP-spezifischen Antikörper. Dies bedeutet, daß die Höhe der Antikörper-gebundenen Radioaktivität umgekehrt proportional zur Konzentration des nicht radioaktivmarkierten, natürlichen cAMP ist. Eine Festlegung der Absolutwerte erfolgt durch Interpolation mit einer Standardkurve.

Inkubation und Stimulation der Zellen

Es kamen konfluente Epithelzellen in 24-Wellplatten mit ca. 600.000 Zellen/Well zum Einsatz. Die Versuche liefen in H/H ++ bei 37°C ab. Die Inkubation mit PDE-Inhibitoren setzte 15 Minuten vor der Stimulation mit Forskolin oder Nitroprussidnatrium ein. Zum Versuchsende wurden die Überstände abgenommen und die Zellen zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol/Well extrahiert. Die Aufbewahrung sowohl der Zellen als auch der Überstände erfolgte für mindestens 12 Stunden bei -20°C. Das Trocknen der Proben fand bei 56°C durch eine kontinuierliche Stickstoffzuführung statt. Alle weiteren Arbeitsschritte konnten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Probenverarbeitung im RIA

Zu jeweils 72 Proben mußte eine Standardkurve mit einer bekannten Menge an nicht radioaktivmarkiertem cAMP erstellt werden. Sie bestand aus einer Verdünnungsreihe von 256 bis 2 fmol cAMP/Röhrchen in 7 Schritten und wurde wie das zu bestimmende Versuchsmaterial behandelt.

Die getrockneten Proben wurden in jeweils 500 µl RIA-Puffer (0.05 M Essigsäure, pH 5.8) aufgenommen. Um die Sensitivität zu erhöhen, erfolgte die Acetylierung von cAMP und cGMP durch Zusatz von 25 µl Acetic Anhydrid und Triethylamin im Verhältnis 1:2. Von jeder Probe mußten 100 µl in die Zentrifugen und Gamma-Zähler geeigneten Röhrchen überführt werden. Es schloß sich die Gabe des Kanninchen-Anti-cAMP-Antikörpers und des Tracers, d.h. des [¹²⁵J]-markierten cAMP an. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden die Proben für 16 Stunden bei +4°C gelagert.

Zur Markierung des Antikörper-gebundenen cAMP folgte die Inkubation mit dem Affen-Anti-Kaninchen-Antikörper für 10 Minuten. Durch Zentrifugation mit 1500 g für 10 Minuten und Abdekantieren des Überstandes konnte diese Fraktion isoliert werden. Die Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte in einem Gamma-Szintillationszähler. Das integrierte RIA-Auswertungsprogramm erlaubte die direkte Umrechnung in die zugehörige cAMP-Konzentration.

2.4 Der PDE-Assay

Um die Aktivität der Phosphodiesterase-Isonenzyme in Zellysaten zu bestimmen, wurde ein nach Bauer et al. modifizierter PDE-Assay durchgeführt (83). Mit dieser Methode konnte die PDE-abhängige Hydrolyse von zyklischen Nukleotiden in Epithelzellen untersucht werden.

Das Prinzip des PDE-Assay

Das Verfahren beruhte auf der Erfassung des Umsatzes von cAMP und cGMP durch Phosphodiesterasen zu nicht-zyklischem AMP und GMP. Nach Lysierung der Zellen und Abbau der endogenen zyklischen Nukleotide wurde eine definierte Menge von im Bereich der Basen radioaktivmarkiertem cAMP bzw. cGMP als Substrat zugeführt. Die vorhandenen PDE-Aktivitäten bauten dieses zu einem bestimmten Anteil zu AMP und GMP ab. Zur Quantifizierung des Produktes mußte eine 5'-Nucleotidase (Crotalus atrox-Toxin) zugeführt werden. Dieses Enzym spaltete spezifisch nur die nicht-zyklischen Nukleotide in die zugehörigen Basen Adenin bzw. Guanin und ihre Ribose-Phosphat-Reste auf. Um das entstandene Gemisch aufzutrennen, kam in diesem Verfahren die unterschiedliche Ladungsverteilung der Bestandteile zum Tragen. Die negativ geladenen Anteile, d.h. das nicht umgesetzte Substrat ($[^3\text{H-cAMP}]$, $[^3\text{H-cGMP}]$) und die Ribose-Phosphat-Reste konnten an Anionenaustauscher-Säulen abgeschieden werden, während die zwar radioaktivmarkierten, aber ungeladenen Basen ungehindert passierten.

Das Grundprinzip dieses Verfahrens ermöglicht es, die Menge des umgesetzten Substrates in eine direkt proportionale Beziehung zu der nach dem Säulendurchgang nachzuweisenden Radioaktivität zu setzen.

Die Probenverarbeitung im PDE-Assay

Für den Assay fanden konfluente Epithelzellen in T-75-Zellkulturflaschen Verwendung. Nach Entfernen des Mediums und sorgfältigem Spülen mit H/H ++ wurden 1.5 ml Extraktionspuffer zugegeben. Es folgte die Ablösung der Zellen mit einem sog. Cellscraper und die

Überführung in ein Eppendorf-Cap. Das auf diesem Wege gewonnene Material wurde bei +4°C gelagert und mit Ultraschall vollständig lysiert (10 Pulse, 60 Watt).

Je nach Protokoll schloß sich die Durchmischung von 2 µl eines bestimmten PDE-Inhibitors mit 50 µl Zellysate in 100 µl Meßpuffer bei 37°C für fünf Minuten an.

Durch Zusatz von 50 µl Substratlösung mit u.a. Tritium-markiertem cAMP oder cGMP startete die Reaktion. Bei 37°C lief sie in pAEC und BEAS-2B für 15 Minuten und in hAEC für 45 Minuten. Zur Beendigung wurde 50 µl 0.2 N HCl zugegeben und auf +4°C abgekühlt. Danach folgte die Inkubation mit 50 µl 5'-Nucleotidase (Crotalus-atrox-Toxin 2 mg/ml in 400 mM Tris-HCl, pH 8.5) für 15 Minuten bei 37°C.

Vorbereitete QAE-Sephadex A-25 Säulen mußten mit jeweils 200 µl Assay-Material beladen und mit 2 ml 30 mM Ammoniumformiat (pH 6.0) in die Szintillationsgefäße eluiert werden. Nach Zusatz von 10 ml Szintillator konnte eine Quantifizierung der Radioaktivität des Eluats im Flüssigkeits-Betaszintillationszähler erfolgen.

Berechnung der Enzymaktivität

Der PDE-Assay erlaubte die Messung der Hydrolyse von cAMP und cGMP zu nicht-zyklischem AMP und GMP. Die Höhe dieses Abbaus war in Gegenwart bestimmter PDE-Inhibitoren vermindert. Dies bedeutete, daß der sich ergebenden Umsatzdifferenz eine Enzymaktivität zuzuordnen war, die durch die Anwesenheit des Inhibitors nicht wirksam werden konnte.

Die oben beschriebene Methode lieferte als Rohdaten nur die Werte der Beta-szintillationszählung in Form von counts per minute [cpm]. Die Höhe der nach einem Säulendurchgang noch nachweisbaren Radioaktivität war proportional zum Substratumsatz. Jeder Probe wurden 5 µM cAMP oder cGMP zugeführt, die einer bestimmten Anzahl an [cpm], den sog. total counts entsprachen. Nach dem Einsatz im Assay zeigten die Messungen der Zellysate-Proben ebenfalls entsprechende [cpm]-Werte. Diese konnten zu den total counts ins Verhältnis gesetzt werden und ergaben damit dem Anteil der 5 µM Substrat, der während der jeweiligen Reaktionszeit umgesetzt worden war.

Die Protein-Konzentration in den Proben ließ sich mit einem Verfahren der Firma BioRad bestimmen. Es erfaßte photometrisch die Farbänderung von Coomassie blue, die durch Protein-Bindung entstand. Als Standard diente BSA. Auf diese Weise konnte die

Enzymaktivität bzw. die Reduktion der Hydrolyse in Gegenwart bestimmter PDE-Inhibitoren in der Einheit [nmol Substratumsatz x Minute⁻¹ x mg Protein⁻¹] ermittelt werden.

Vorbereitung der Säulen

Um die Bildung von nicht-zyklischen Nukleotiden zu erfassen, war eine Auftrennung der Zellysatzbestandteile nach ihren Ladungseigenschaften notwendig. Dies geschah mit Hilfe eines Anionenaustauscher-Systems. Es wurden QAE-Sephadex A-25 Säulen mit 1 ml Packungsvolumen eingesetzt.

Unmittelbar vor dem Einsatz im PDE-Assay erfolgte die Konditionierung. Dazu mußten nacheinander je 2 ml 0.2 N NaOH und 0.2 N HCl sowie intermitierend destilliertes Wasser zugeführt werden. Der Abschluß der Vorbereitung bestand in der Gabe von 4 ml Ammoniumformiat (pH 6.0) je Säule.

Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer

PBS mit HEPES 10 mM, 1mM EGTA, MgCl_2 1 mM, Dithiothreitol 5 mM, Pepstatin 5 μM , Leupeptin 10 μM , Trypsin Inhibitor 10 μM und Benzamidin 2 mM.

Meßpuffer

Trispuffer 60 mM (pH 7.4) mit MgCl_2 5 mM, CaCl_2 1.25 mM und Calmodulin 100 μM .

Substratlösung

Meßpuffer mit MgCl_2 200 mM, nicht-radioaktivmarkiertes cAMP bzw. cGMP 20 μM und ^3H -markiertes cAMP (20-30 Ci/mmol) bzw. cGMP (5-25 Ci/mmol) 20 μM , entsprechend einem total count von ca. 30000 cpm.

2.5 Statistische Methoden

Im Text und in den Abbildungen wurden die Mittelwerte und die zugehörigen SEM-Werte (Standard error of the mean) angegeben. Die Signifikanzberechnungen erfolgten mit Hilfe der Varianzanalyse und durch Student-t-Tests für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0.05$ angenommen (119).

3. Ergebnisse

3.1 cAMP und cGMP in Atemwegsepithelzellen

3.1.1 Toxizität von Stimuli und Inhibitoren

Im Rahmen der Bestimmung der zyklischen Nukleotide in den Epithelzellen erfolgte eine Beeinflussung mit verschiedenen Inhibitoren und Stimuli. Um eine toxische Schädigung durch diese Stoffe bzw. durch die verwendeten Lösungsmittel auszuschließen, wurde neben einer morphologischen Kontrolle der Zellen eine Messung der Lactatdehydrogenase (LDH) durchgeführt (Tabelle 1).

Tab. 1: LDH-Freisetzung aus Atemwegsepithelzellen des Schweines (pAEC)

unbehandelt		1.9 ± 0.5	
Stimulus		Forskolin 1 µM	SNP 10 µM
		2.4 ± 0.6	2.2 ± 0.6
+ PDE-Inhibitor			
IBMX	100 µM	3.4 ± 0.5	3.5 ± 0.6
Vinpocetin	100 µM	1.6 ± 0.3	2.9 ± 0.5
EHNA	100 µM	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
Motapizon	100 µM	2.6 ± 0.3	2.7 ± 0.4
Rolipram	100 µM	2.3 ± 0.8	2.8 ± 0.2
Zaprinast	100 µM	2.8 ± 0.3	2.9 ± 0.6
Rolipram	10 µM + Probenicid 1 mM	8.1 ± 1.5	(-)
Zaprinast	10 µM + Probenicid 1 mM	(-)	6.4 ± 1.1

Darstellung der im Überstand gemessenen LDH-Werte als Prozentsatz der Gesamt-LDH. Nach Inkubation mit den PDE-Inhibitoren und Probenicid für 15 Minuten jeweils Stimulation mit Forskolin oder Nitroprussidnatrium (SNP) für 30 Minuten. Bestimmung der Gesamt-LDH nach Zugabe von Melltin 1 M. (Mittelwert ± SEM, mind. n=4)

3.1.2 Zeitlicher Verlauf der Bildung von cAMP und cGMP in Atemwegsepithelzellen des Schweines (pAEC)

Primär isolierte Atemwegsepithelzellen vom Schwein (pAEC) wurden auf die Zeitabhängigkeit ihres cAMP- und cGMP-Metabolismus hin untersucht. Nach Inkubation mit spezifischen Inhibitoren der PDE-Isoenzymfamilien 1 bis 5 wurde eine Stimulation der cAMP-Produktion mit Forskolin bzw. der cGMP-Produktion mit SNP durchgeführt. Die Bestimmung von intrazellulärem cAMP und cGMP erfolgte 0, 2, 5, 15 und 30 Minuten nach Ende der Inkubation. Die inkubierten und stimulierten Zellen wurden mit unbehandelten bzw. nur stimulierten, aber nicht mit Inhibitor behandelten Zellen verglichen. (Abb. 7 und 8)

cAMP-Zeitreihe in pAEC

Die unbehandelten Zellen ergaben Werte zwischen 2.1 und 4.0 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. Ab einer Stimulationsdauer von 2 Minuten zeigten die nur Forskolin ausgesetzten sowie die zusätzlich mit den Inhibitoren der PDE-Familien 1, 2, 3 oder 5 inkubierten Zellen einen statistisch signifikanten Anstieg auf 19.3 ± 4.5 bis 28.1 ± 4.9 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. Die Anwendung von Rolipram 10 μ M (PDE4-Inhibitor) führte ab dem Meßzeitpunkt 2 Minuten ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg, erreichte aber Werte bis 117 ± 12.7 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=6), (Abb. 7)

cGMP-Zeitreihe in pAEC

Die Werte in unbehandelten Zellen schwankten zwischen 0.18 und 0.24 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Ab einer Stimulationsdauer von 5 Minuten zeigten die nur SNP ausgesetzten sowie die zusätzlich mit den Inhibitoren der PDE-Familien 1, 2, 3 oder 4 inkubierten Zellen eine signifikante Erhöhung auf 0.81 ± 0.11 bis 1.54 ± 0.22 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Dahingegen führte der Einsatz von Zaprinast 10 μ M (PDE5-Inhibitor) bereits ab der 2. Minute zu einem statistisch signifikanten Anstieg auf Werte bis 8.22 ± 0.92 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=6), (Abb. 8)

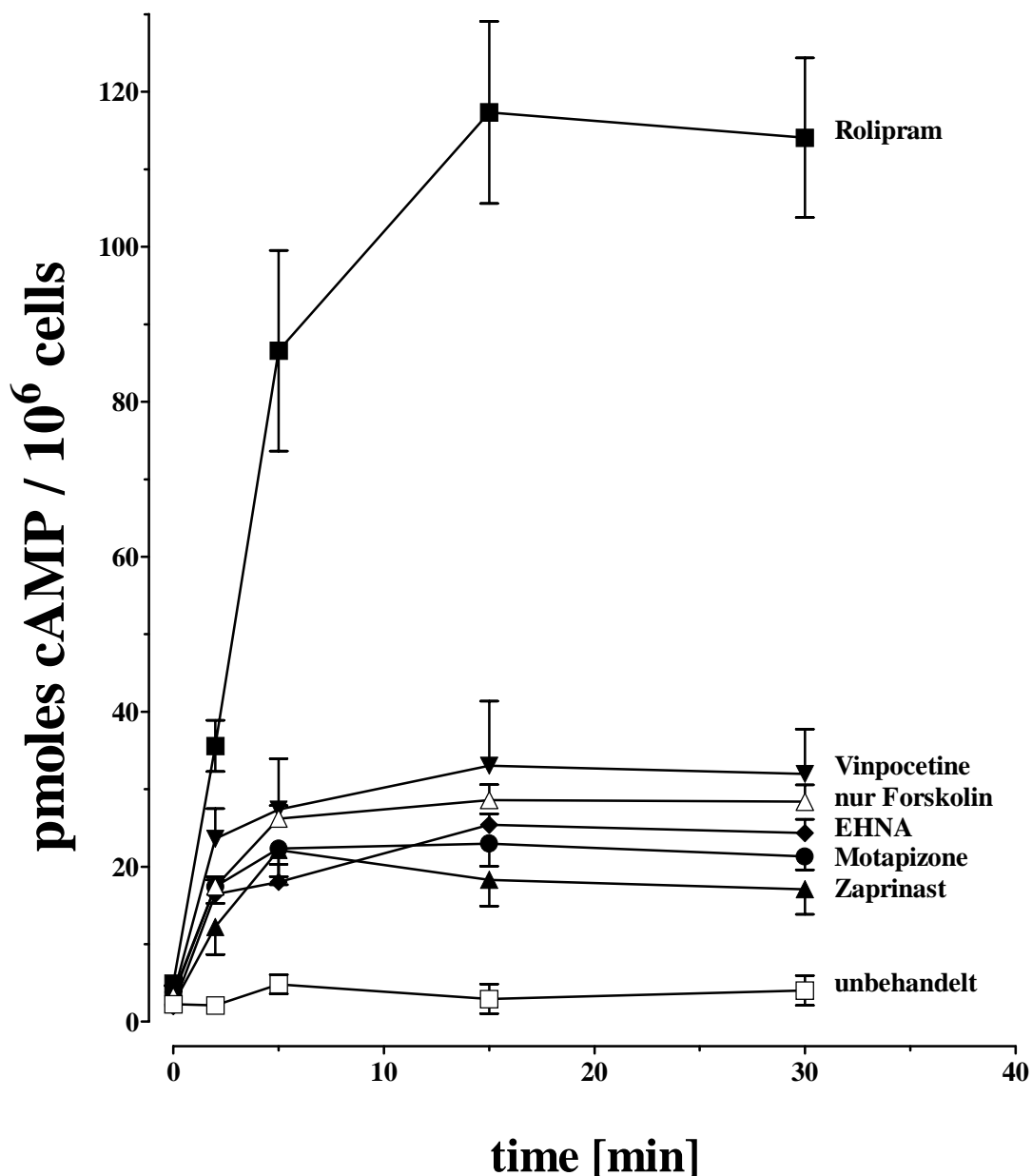


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der cAMP-Bildung in pAEC

Inkubation mit den PDE-Inhibitoren Vinpocetin 100 μ M, EHNA 100 μ M, Motapizon 1 μ M, Rolipram 10 μ M und Zaprinast 10 μ M für 15 Minuten, dann Stimulation mit Forskolin 1 μ M zum Zeitpunkt 0 Minuten. Statistisch signifikante Zunahme gegenüber den unbehandelten Zellen ab der 2. Minute. Die Analyse der zeitlichen Verläufe der nur Forskolin stimulierten Zellen und der zusätzlich mit den Inhibitoren Vinpocetin (PDE1), EHNA (PDE2), Motapizon (PDE3) oder Zaprinast (PDE5) behandelten Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz dazu bewirkte Rolipram (PDE4-Inhibitor) eine signifikante cAMP-Zunahme verglichen mit den nur Forskolin stimulierten Zellen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=6)

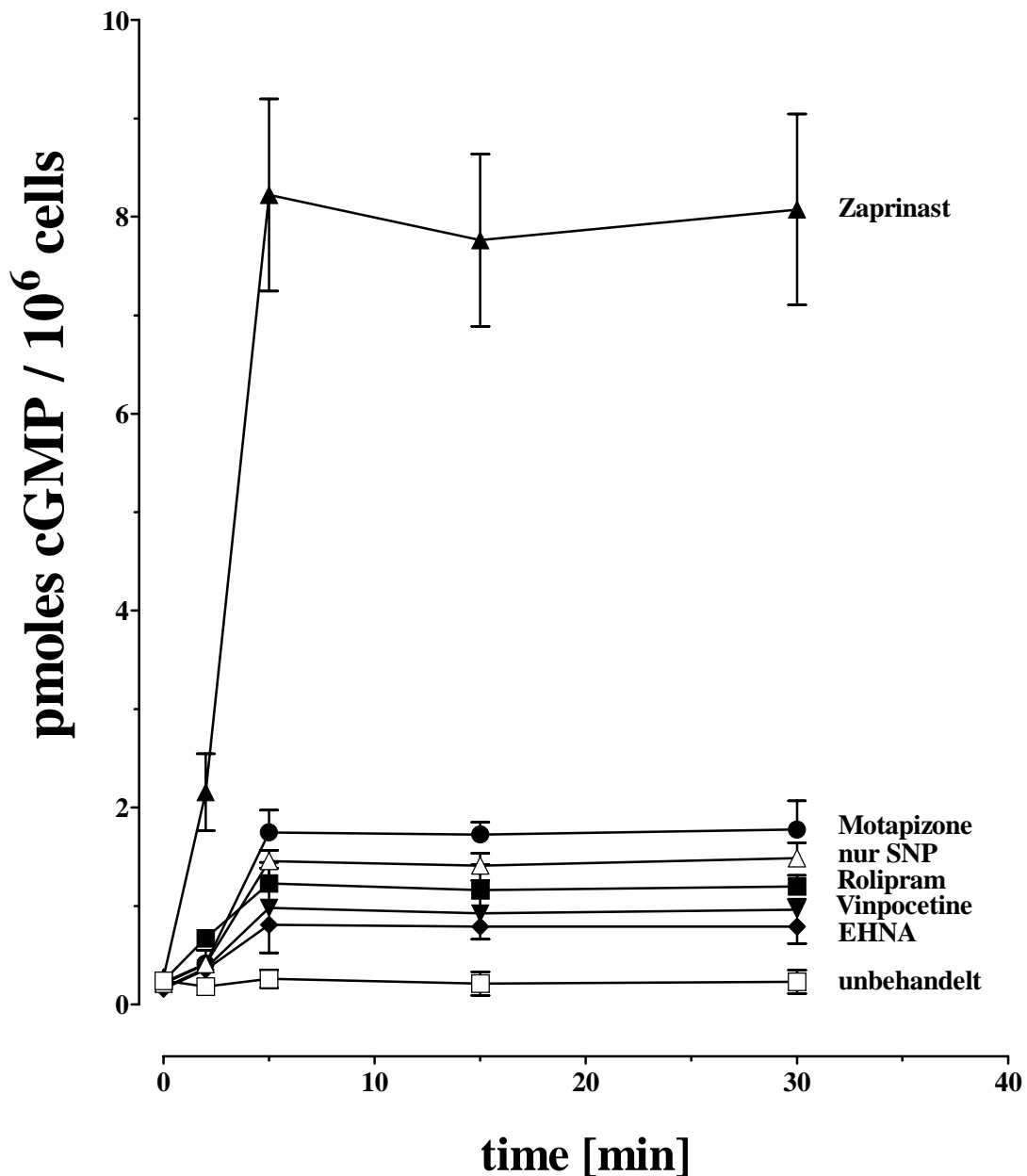


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der cGMP-Bildung in pAEC

Inkubation mit den PDE-Inhibitoren Vinpocetin 100 μ M, EHNA 100 μ M, Motapizon 1 μ M, Rolipram 10 μ M und Zaprinas 10 μ M für 15 Minuten, dann Stimulation mit Nitroprussidnatrium (SNP) 10 μ M zum Zeitpunkt 0 Minuten. Statistisch signifikante Zunahme im Vergleich mit den unbehandelten Zellen ab der 5. Minute. Die Analyse der zeitlichen Verläufe der nur SNP stimulierten Zellen und der zusätzlich mit den Inhibitoren Vinpocetine (PDE1), EHNA (PDE2), Motapizon (PDE3) oder Rolipram (PDE4) behandelten Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied. Bei Anwendung von Zaprinas (PDE5-Inhibitor) signifikanter Anstieg ab der 2. Minute verglichen mit den nur SNP stimulierten Zellen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=6)

3.1.3 Vergleich von Atemwegsepithelzellen des Menschen (hAEC), des Schweines (pAEC) und der Zelllinie BEAS-2B

Primär isolierte Atemwegsepithelzellen vom Menschen (hAEC) und vom Schwein (pAEC), sowie die humane Epithelzelllinie BEAS-2B wurden bezüglich ihres cAMP- und cGMP-Metabolismus untersucht. Nach Inkubation mit spezifischen Inhibitoren der PDE-Isoenzymfamilien 1 bis 5 erfolgte eine Stimulation der cAMP-Bildung mit Forskolin bzw. der cGMP-Bildung mit SNP. Die Messung von intrazellulärem cAMP und cGMP wurde nach einer Stimulationsdauer von 30 Minuten durchgeführt. Die so beeinflussten Zellen wurden mit unbehandelten bzw. nur stimulierten, aber nicht mit PDE-Inhibitoren inkubierten Zellen verglichen ([U] bzw. [N] in Abb. 9 und 10).

cAMP in hAEC, pAEC und BEAS-2B

Die Bestimmung der unbehandelten Zellen (U) ergab für hAEC 0.42 ± 0.05 , für pAEC 4.01 ± 0.34 und für BEAS-2B 3.48 ± 0.57 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. Die lediglich mit Forskolin stimulierten, sowie die zusätzlich mit den Inhibitoren der PDE-Familien 1, 2, 3 oder 5 inkubierten Zellen zeigten für hAEC zwischen 7.46 ± 0.62 und 9.55 ± 1.78 , für pAEC zwischen 21.09 ± 5.87 und 31.87 ± 5.75 und für BEAS-2B zwischen 13.73 ± 1.65 und 17.98 ± 3.34 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. Bezogen auf die zugehörigen unbehandelten Zellen (U) bedeutete dies jeweils einen signifikanten Anstieg. Der Einsatz von Rolipram 10 μ M (PDE4-Inhibitor) bewirkte eine drastische Erhöhung auf Werte von 26.74 ± 4.08 für hAEC, 114 ± 10.31 für pAEC und 110.54 ± 26.71 pmol cAMP/ 10^6 Zellen für BEAS-2B. Im Vergleich mit den nur stimulierten Zellen (N) handelte es sich damit um eine zusätzliche signifikante Zunahme. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5), (Abb. 9)

cGMP in hAEC, pAEC und BEAS-2B

Die unbehandelten Zellen (U) lieferten für hAEC 0.012 ± 0.002 , für pAEC 0.23 ± 0.03 und für BEAS-2B 0.28 ± 0.05 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Die nur mit SNP stimulierten, sowie die zusätzlich mit Inhibitoren der PDE-Familien 2, 3 oder 4 inkubierten Zellen ergaben für hAEC zwischen 0.062 ± 0.006 und 0.64 ± 0.01 , für pAEC zwischen 0.85 ± 0.11 und 1.51 ± 0.28 und für BEAS-2B zwischen 2.01 ± 0.23 und 2.79 ± 0.25 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Im Vergleich mit den jeweiligen unbehandelten Zellen (U) zeigte sich hier eine signifikante Zunahme. Bei Einsatz von Vinpocetin 100 μ M (PDE1-Inhibitor) in humanen Atemwegsepithelzellen (hAEC) ergab sich gegenüber den nur stimulierten Zellen (N) ein signifikanter Anstieg auf 0.11 ± 0.01 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Bei Anwendung von Vinpocetin in pAEC und BEAS-2B mit Werten von 0.92 ± 0.21 bzw. 2.25 ± 0.19 pmol cGMP/ 10^6 Zellen fehlte dieser Unterschied. Die Inkubation mit Zaprinast 10 μ M (PDE5-Inhibitor) führte in allen drei Zelltypen zu einer deutlichen und signifikanten Erhöhung im Vergleich zu den nur stimulierten Zellen (N). Die Messungen ergaben für hAEC 0.22 ± 0.01 , für pAEC 8.08 ± 0.97 und für BEAS-2B 16.83 ± 1.44 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5), (Abb. 10)

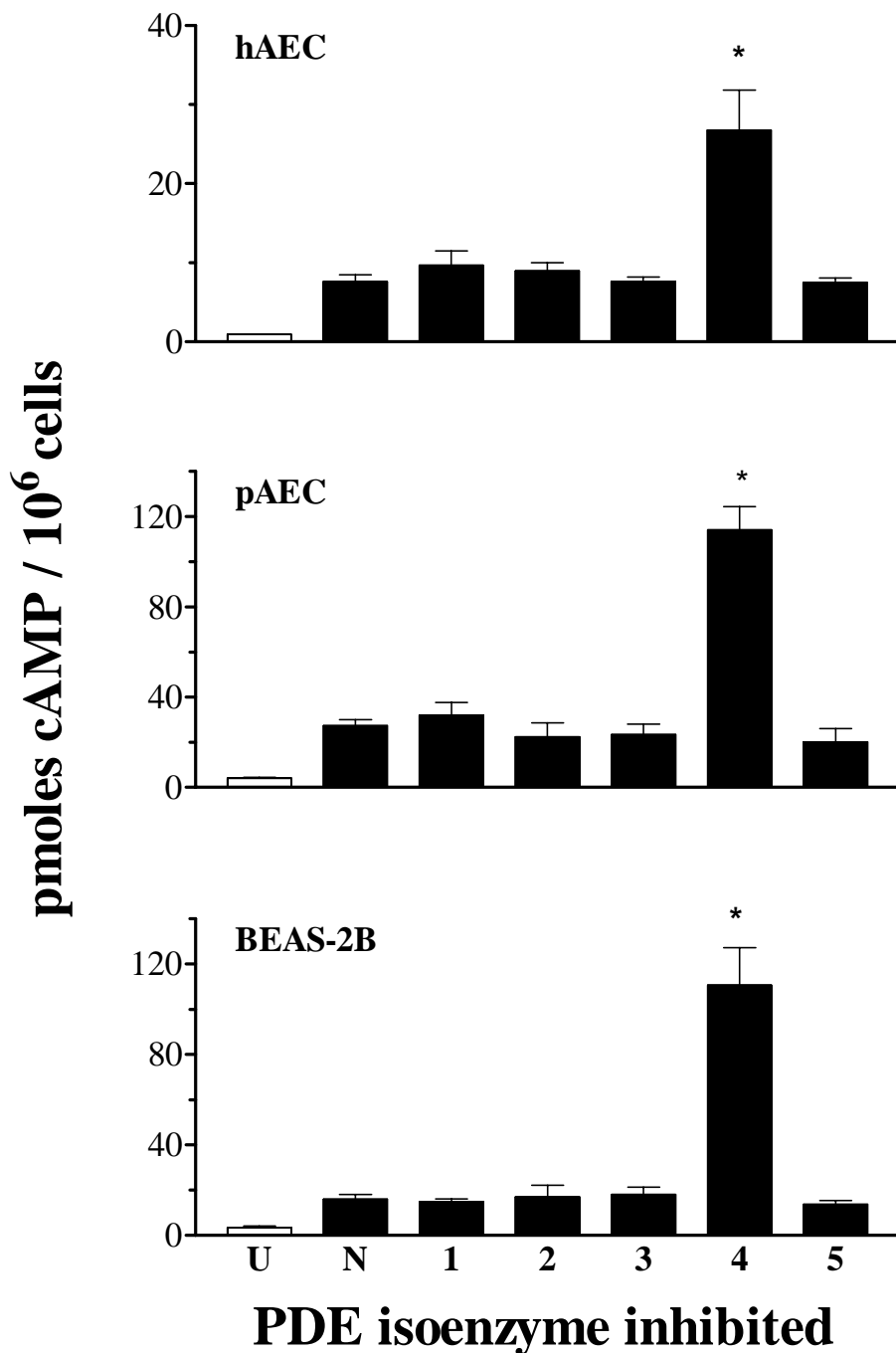


Abb. 9: Vergleich der cAMP-Akkumulation in hAEC, pAEC und BEAS-2B

15 Minuten Inkubation mit Inhibitoren der PDE-Familien 1 (Vinpocetin 100 μ M), 2 (EHNA 100 μ M), 3 (Motapizon 1 μ M), 4 (Rolipram 10 μ M) und 5 (Zaprinast 10 μ M) und Stimulation mit Forskolin 1 μ M für 30 Minuten. In allen drei Zelltypen signifikante Erhöhung gegenüber den unbehandelten Zellen (U). Kein signifikanter Unterschied zwischen nur stimulierten Zellen (N) und den zusätzlich PDE1, 2, 3 oder 5 inhibierten Zellen. In allen Zellen führte Rolipram (PDE4-Inhibitor) zu einer signifikanten Zunahme (*) im Vergleich zu den nur stimulierten Zellen (N). Beachte die unterschiedlichen Größenordnungen der cAMP-Absolutzahlen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

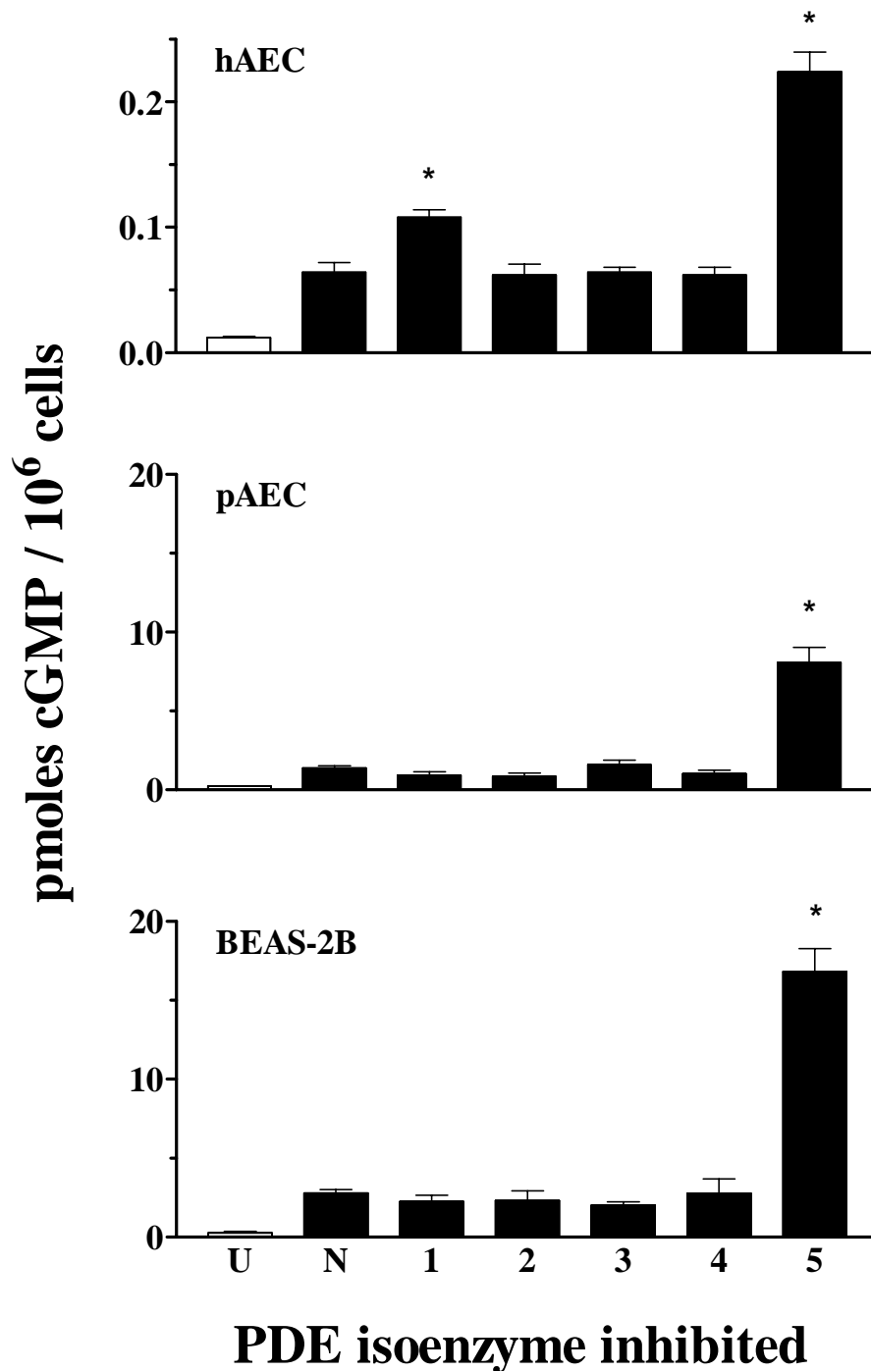


Abb. 10: Vergleich der cGMP-Akkumulation in hAEC, pAEC und BEAS-2B

15 Minuten Inkubation mit Inhibitoren der PDE1 (Vinpocetin 100 μ M), 2 (EHNA 100 μ M), 3 (Motapizone 1 μ M), 4 (Rolipram 10 μ M) und 5 (Zaprinast 10 μ M) und Stimulation mit SNP 10 μ M für 30 Minuten. Signifikante Erhöhung gegenüber den unbehandelten Zellen (U) in allen drei Zelltypen. Inhibition der PDE2, 3 oder 4 führte zu keiner signifikanten Änderung im Vergleich mit nur stimulierten Zellen (N). Zaprinast bewirkte eine zusätzliche signifikante Zunahme (*) in allen drei Zelltypen. Die PDE1-Inhibition (Vinpocetin) erreichte nur in hAEC eine signifikante Erhöhung (*) gegenüber nur stimulierten Zellen (N). Beachte die unterschiedlichen Größenordnungen der cGMP-Absolutzahlen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

3.1.4 IC₅₀ für Rolipram und Zaprinast in pAEC und BEAS-2B

In primär isolierte Atemwegsepithelzellen vom Schwein (pAEC) und der humanen Epithelzelllinie BEAS-2B wurden die PDE-Isoenzymfamilien 4 und 5 gehemmt. Als spezifischer Inhibitor der PDE-Familie 4 wurde Rolipram und der PDE-Familie 5 Zaprinast in einer Konzentrationsreihe von 10^{-9} bis 10^{-4} M verwendet. Nach Inkubation der Inhibitoren fand in den Rolipram behandelten Zellen eine Stimulation der cAMP-Produktion mit Forskolin und in den Zaprinast ausgesetzten Zellen eine Stimulation der cGMP-Produktion mit SNP statt. Die Bestimmung von intrazellulärem cAMP und cGMP erfolgte 30 Minuten nach Ende der Inhibitor-Inkubation. Die so beeinflussten Zellen wurden mit nur stimulierten, aber nicht mit Inhibitor behandelten Zellen verglichen.

cAMP-Erhöhung durch den Inhibitor Rolipram in pAEC und BEAS-2B

Ab einer Rolipram-Konzentration von 10^{-8} M zeigte sich eine signifikante Zunahme gegenüber den lediglich mit Forskolin stimulierten Zellen. Eine Steigerung der Inhibitor-Konzentration über 10^{-5} M hinaus führte zu keiner weiteren signifikanten cAMP-Erhöhung. Die IC₅₀ (one-half inhibitory concentration) für den PDE4-Inhibitor Rolipram betrug in pAEC 3.4×10^{-7} M und in BEAS-2B 4.86×10^{-7} M. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=4), (Abb. 11)

cGMP-Erhöhung durch den Inhibitor Zaprinast in pAEC und BEAS-2B

Eine signifikante Steigerung gegenüber den nur SNP stimulierten Zellen zeigte sich in pAEC ab einer Zaprinast-Konzentration von 10^{-7} M und in BEAS-2B ab 10^{-6} M. In beiden Zelltypen bewirkte eine Erhöhung der Inhibitor-Konzentration über 10^{-5} M hinaus keine zusätzliche signifikante cGMP-Erhöhung mehr. Die Berechnung der IC₅₀ (one-half inhibitory concentration) ergab für den PDE5-Inhibitor Zaprinast in pAEC 1×10^{-6} M und in BEAS-2B 2.12×10^{-6} M. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=4), (Abb. 12)

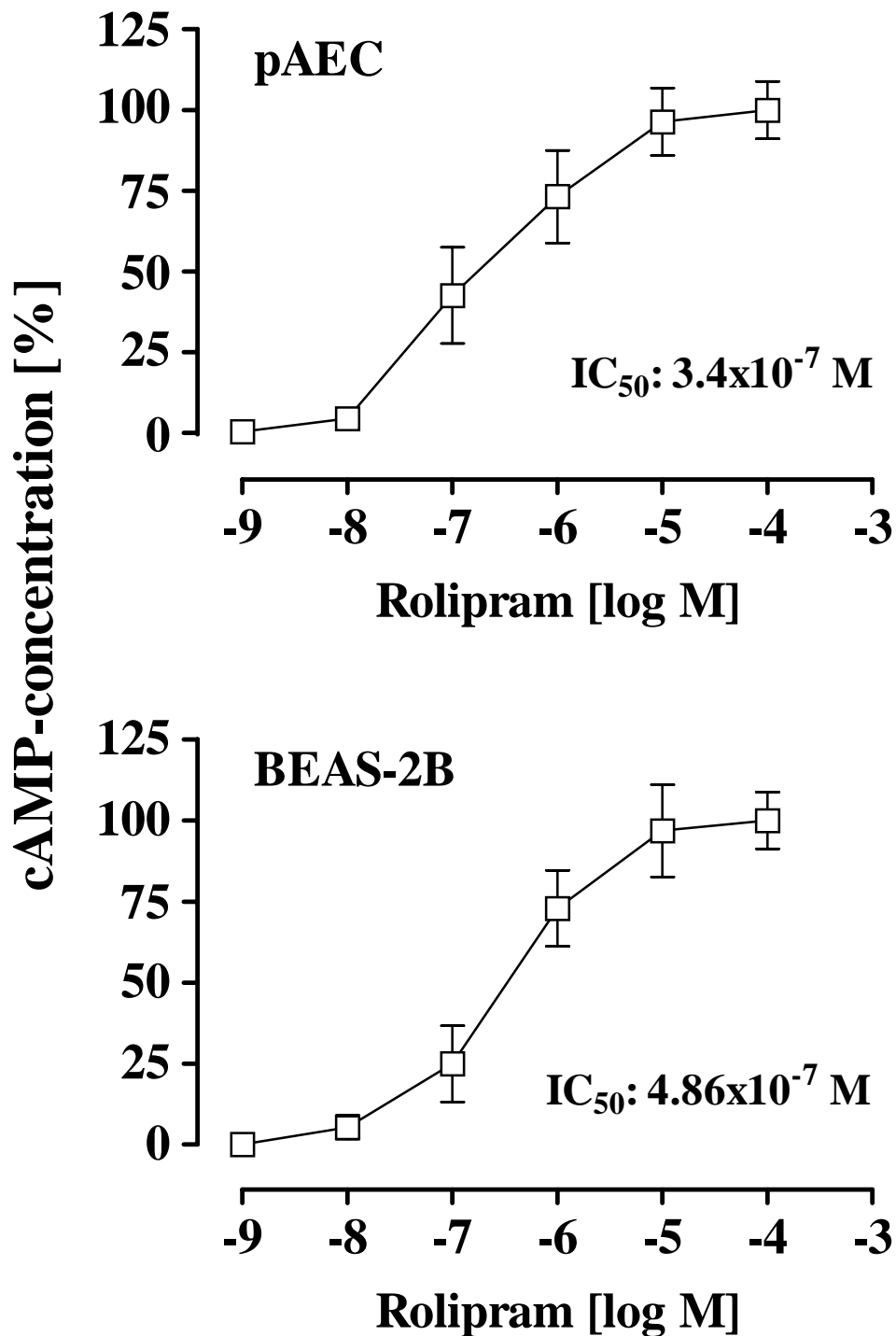


Abb. 11: Dosisabhängige cAMP-Erhöhung durch Rolipram

Nach 15 Minuten Inkubation von pAEC und BEAS-2B mit PDE4-Inhibitor Rolipram in Konzentrationen von 10⁻⁹ bis 10⁻⁴ M, Stimulation mit Forskolin 1 µM für 30 Minuten. Darstellung als cAMP-Zunahme im Vergleich mit nur stimulierten, aber nicht mit Inhibitor behandelten Zellen. Signifikante Erhöhung von cAMP ab einer Rolipram-Konzentration von 10⁻⁸ M. Ab Inhibitor-Konzentrationen größer 10⁻⁵ M keine weitere signifikante cAMP-Steigerung. (Mittelwert ± SEM, mind. n=4)

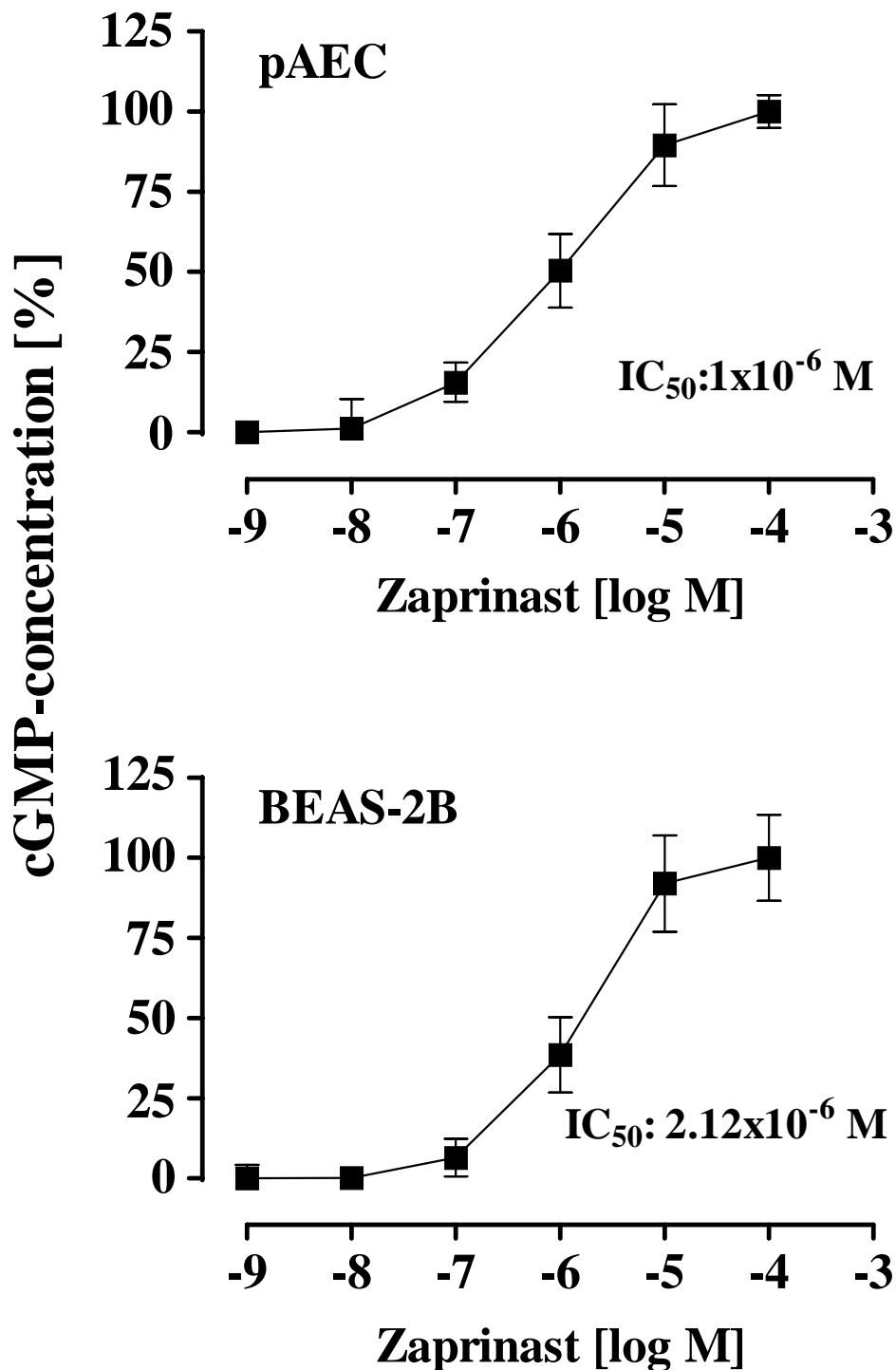


Abb. 12: Dosisabhängige cGMP-Erhöhung durch Zaprinast

Nach 15 Minuten Inkubation von pAEC und BEAS-2B mit dem PDE5-Inhibitor Zaprinast in Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-4} M, Stimulation mit SNP $10 \mu\text{M}$ für 30 Minuten. Darstellung als cGMP-Zunahme im Vergleich mit nur stimulierten, aber nicht mit Inhibitor behandelten Zellen. Signifikante cGMP-Erhöhung in pAEC ab einer Zaprinast-Konzentration von 10^{-7} M und in BEAS-2B ab 10^{-6} M. In beiden Zelltypen keine weitere signifikante cGMP-Steigerung ab einer Inhibitor-Konzentration größer als 10^{-5} M. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=4)

3.1.5 Bestimmung der intra- und extrazellulären Konzentrationen von cAMP und cGMP

An primär isolierten Atemwegsepithelzellen vom Schwein (pAEC) und der humanen Epithelzelllinie BEAS-2B wurden Messungen von intra- und extrazellulärem cAMP und cGMP in Gegenwart spezifischer PDE-Inhibitoren durchgeführt. Nach Inkubation mit Inhibitoren der PDE-Isoenzymfamilien 1 bis 5 erfolgte eine Stimulation der cAMP-Bildung mit Forskolin bzw. der cGMP-Bildung mit SNP. Die Bestimmung von intra- und extrazellulärem cAMP und cGMP wurde nach einer Stimulation von 30 Minuten vorgenommen. Die so beeinflussten Zellen wurden mit unbehandelten bzw. nur stimulierten, aber nicht mit PDE-Inhibitor inkubierten Zellen verglichen ([U] bzw. [N] in Abb. 7 und 8). Aus der Summe der jeweiligen intra- und extrazellulären Messungen wurden die angegebenen cAMP- und cGMP-Gesamtmenge errechnet.

Intra- und extrazelluläres cAMP in pAEC und BEAS-2B

Die unstimulierten Zellen (U) ergaben ein Gesamt-cAMP von 5.8 ± 0.4 in pAEC und 5.1 ± 0.9 pmol cAMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Die nur stimulierten Zellen (N) zeigten einen hierzu signifikanten Anstieg auf ein Gesamt-cAMP von 35.9 ± 3.4 in pAEC und 23.3 ± 3.0 pmol cAMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Eine Inhibition der PDE-Isoenzymfamilien 1, 2, 3 oder 5 ergab ein Gesamt-cAMP zwischen 26.6 ± 5.7 und 41.0 ± 7.8 in pAEC und zwischen 16.8 ± 2.4 und 25.7 ± 4.0 pmol cAMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Dies bedeutete keinen signifikanten Unterschied zu den nur stimulierten Zellen (N). Die Inhibition der PDE-Familie 4 mit Rolipram $10 \mu\text{M}$ führte zu einem Gesamt-cAMP von 183.9 ± 15.0 in pAEC und 164.8 ± 24.8 pmol cAMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Im Vergleich mit den nur stimulierten Zellen (N) ergab sich damit eine signifikante Zunahme. Der Anteil des extrazellulären cAMP an der Gesamtmenge lag in pAEC bei 32.9 ± 5.7 % und in BEAS-2B bei 31.8 ± 3.0 %, wobei sich zwischen unterschiedlich behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich dieser Prozentsätze ergaben. Die oben beschriebenen Signifikanzen zeigten sich auch bei einer getrennten Betrachtung von intra- und extrazellulären Messungen. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5), (Abb. 13 a und b)

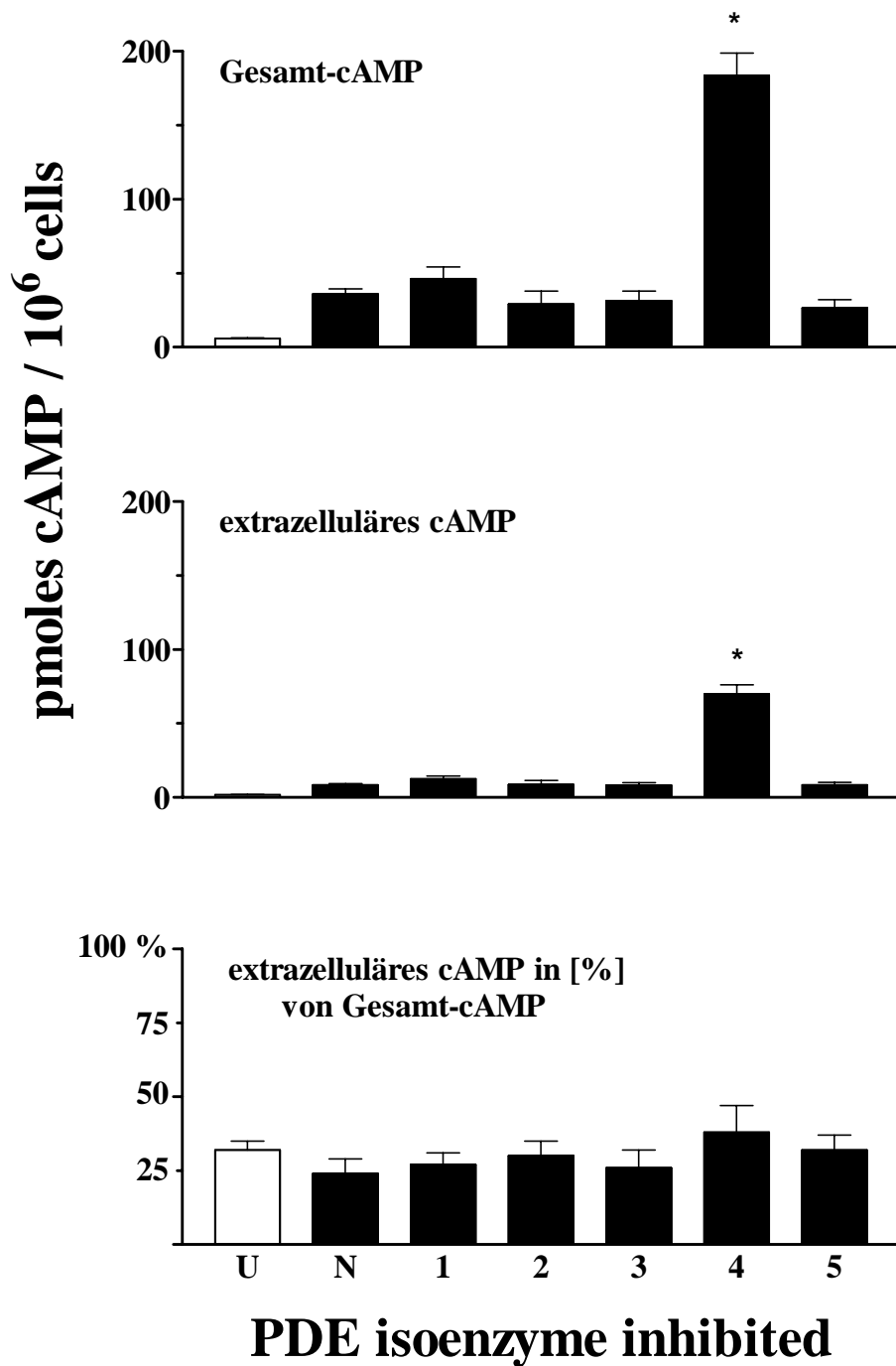


Abb. 13 a: Intra- und extrazelluläres cAMP in pAEC

Nach 15 Minuten Inkubation mit Inhibitoren der PDE1 (Vinpocetin 100 μ M), 2 (EHNA 100 μ M), 3 (Motapizone 1 μ M), 4 (Rolipram 10 μ M) und 5 (Zaprinast 10 μ M), Stimulation mit Forskolin 1 μ M für 30 Minuten. Für extrazelluläres und gesamtes cAMP gilt: Signifikante Erhöhung im Vergleich mit unbehandelten Zellen (U). Inhibition von PDE1, 2, 3 oder 5 bleibt ohne signifikante Änderung gegenüber nur stimulierten Zellen (N). Anwendung von Rolipram (PDE4-Inhibitor) führt zu einem zusätzlichen signifikanten Anstieg (*). Die unterschiedliche Behandlung der Zellen blieb ohne signifikanten Einfluß auf den prozentualen Anteil des extrazellulär nachweisbaren cAMP. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

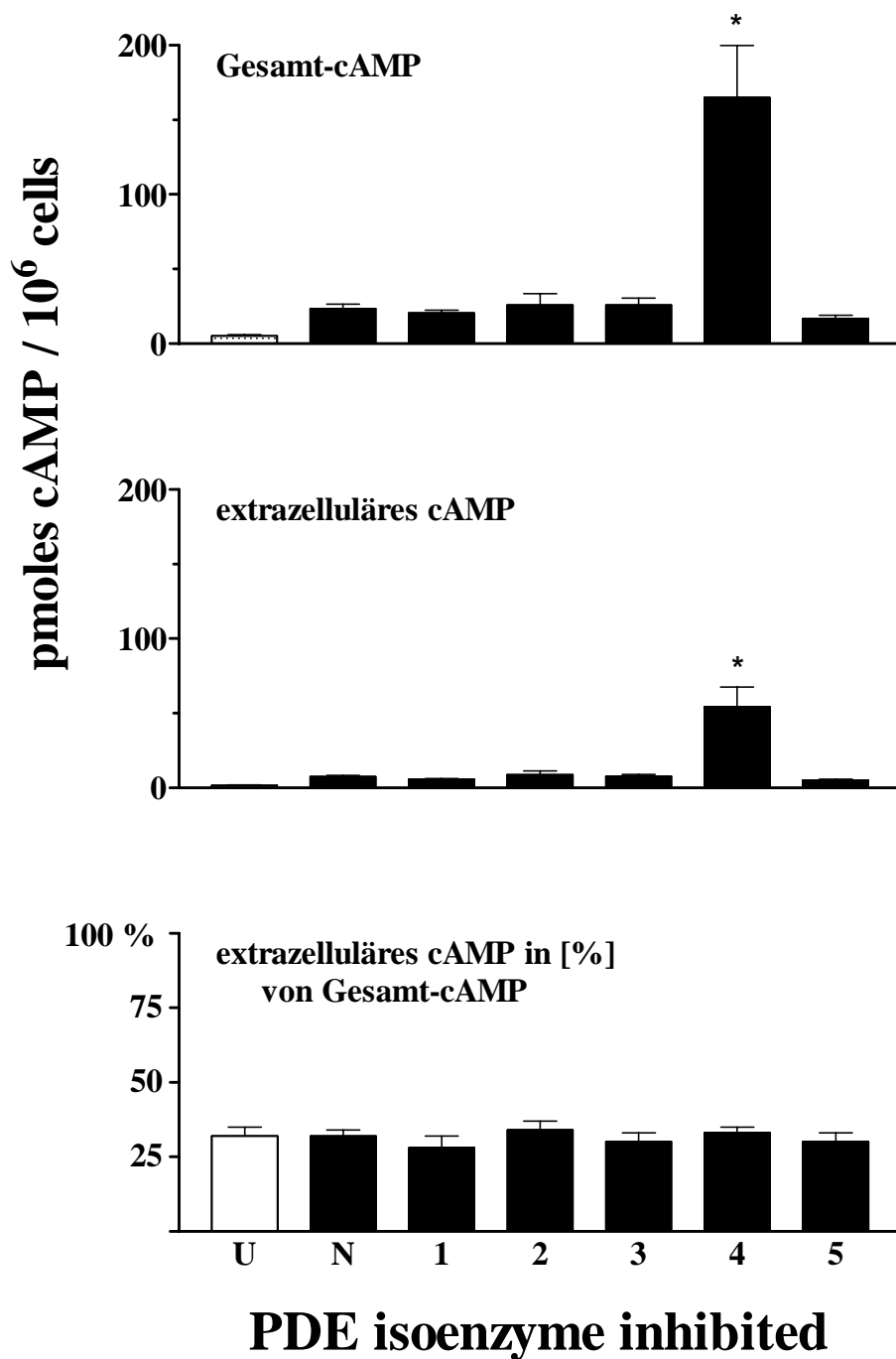


Abb. 13 b: Intra- und extrazelluläres cAMP in BEAS-2B

15 Minuten Inkubation mit Inhibitoren der PDE1 (Vinpocetin 100 μ M), 2 (EHNA 100 μ M), 3 (Motapizon 1 μ M), 4 (Rolipram 10 μ M) und 5 (Zaprinast 10 μ M) und Stimulation mit Forskolin 1 μ M für 30 Minuten. Für extrazelluläres und gesamtes cAMP gilt: Signifikante Erhöhung im Vergleich mit unbehandelten Zellen (U). Inhibition von PDE1, 2, 3 oder 5 bleibt ohne signifikante Änderung gegenüber nur stimulierten Zellen (N). Anwendung von Rolipram (PDE4-Inhibitor) führt zu einem zusätzlichen signifikanten Anstieg (*). Die unterschiedliche Behandlung der Zellen blieb ohne signifikanten Einfluß auf den prozentualen Anteil des extrazellulär nachweisbaren cAMP. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

Intra- und extrazelluläres cGMP in pAEC und BEAS-2B

In unstimulierten Zellen (U) ergab sich ein Gesamt-cGMP von 0.52 ± 0.06 in pAEC und 0.84 ± 0.09 pmol cGMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Mit einem Gesamt-cGMP von 3.08 ± 0.31 in pAEC und 8.99 ± 0.73 pmol cGMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B zeigten die stimulierten Zellen (N) eine hierzu signifikante Erhöhung. Eine Inhibition der PDE-Isoenzymfamilien 1 bis 5 führte zu einem Gesamt-cGMP zwischen 1.49 ± 0.31 und 2.18 ± 0.37 in pAEC und zwischen 5.72 ± 0.57 und 8.56 ± 1.90 pmol cGMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Damit ergab sich im Vergleich mit den nur stimulierten Zellen (N) kein signifikanter Unterschied. Die Inhibition der PDE-Familie 5 mit Zaprinast $10 \mu\text{M}$ bewirkte jedoch eine signifikante Zunahme gegenüber den nur stimulierten Zellen (N) auf 12.15 ± 1.94 in pAEC und 45.48 ± 3.88 pmol cGMP/ 10^6 Zellen in BEAS-2B. Der Anteil des extrazellulären cGMP an der Gesamtmenge betrug in pAEC $53.1 \pm 4.3 \%$ und in BEAS-2B $67.3 \pm 4.6 \%$, wobei sich zwischen unterschiedlich behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich dieser Prozentsätze ergaben. Auch bei Betrachtung der extrazellulären Messungen zeigten sich die oben beschriebenen Signifikanzen. (Mittelwert \pm SEM, mind. $n=5$), (Abb. 14 a und b)

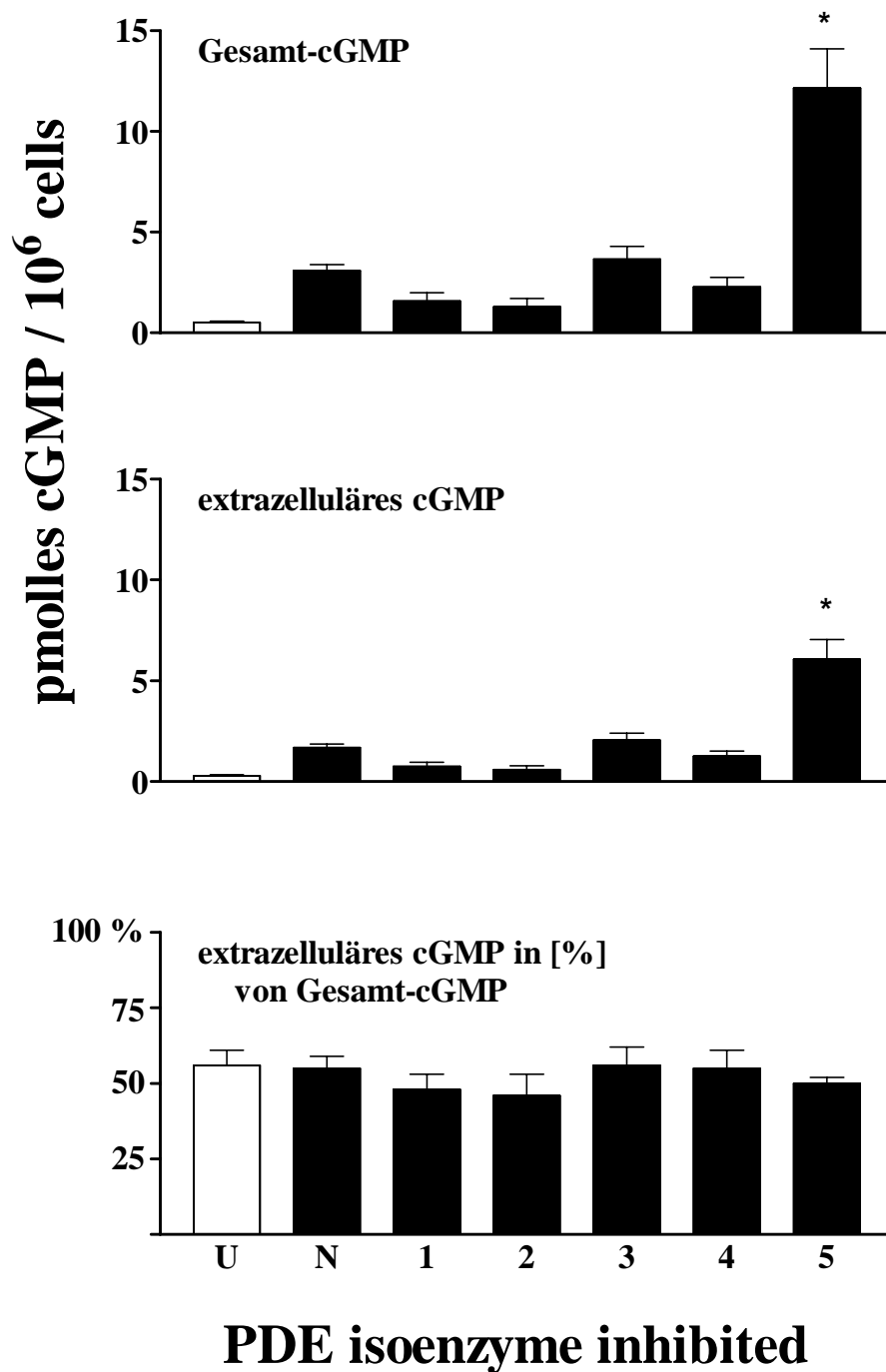


Abb. 14 a: Intra- und extrazelluläres cGMP in pAEC

Nach Inkubation von 15 Minuten mit Inhibitoren der PDE1 (Vinpocetin 100 μ M), 2 (EHNA 100 μ M), 3 (Motapizon 1 μ M), 4 (Rolipram 10 μ M) und 5 (Zaprinast 10 μ M), Stimulation mit SNP 10 μ M für 30 Minuten. Für extrazelluläres und gesamtes cGMP gilt: Signifikante Erhöhung im Vergleich mit unbehandelten Zellen (U). Inhibition von PDE1, 2, 3 oder 4 führt nicht zu einer signifikanten Änderung gegenüber nur stimulierten Zellen (N). Einsatz von Zaprinast (PDE5-Inhibitor) bewirkt zusätzliche signifikante Steigerung (*). Die unterschiedliche Behandlung der Zellen blieb ohne signifikanten Einfluß auf den prozentualen Anteil des extrazellulär nachweisbaren cGMP. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

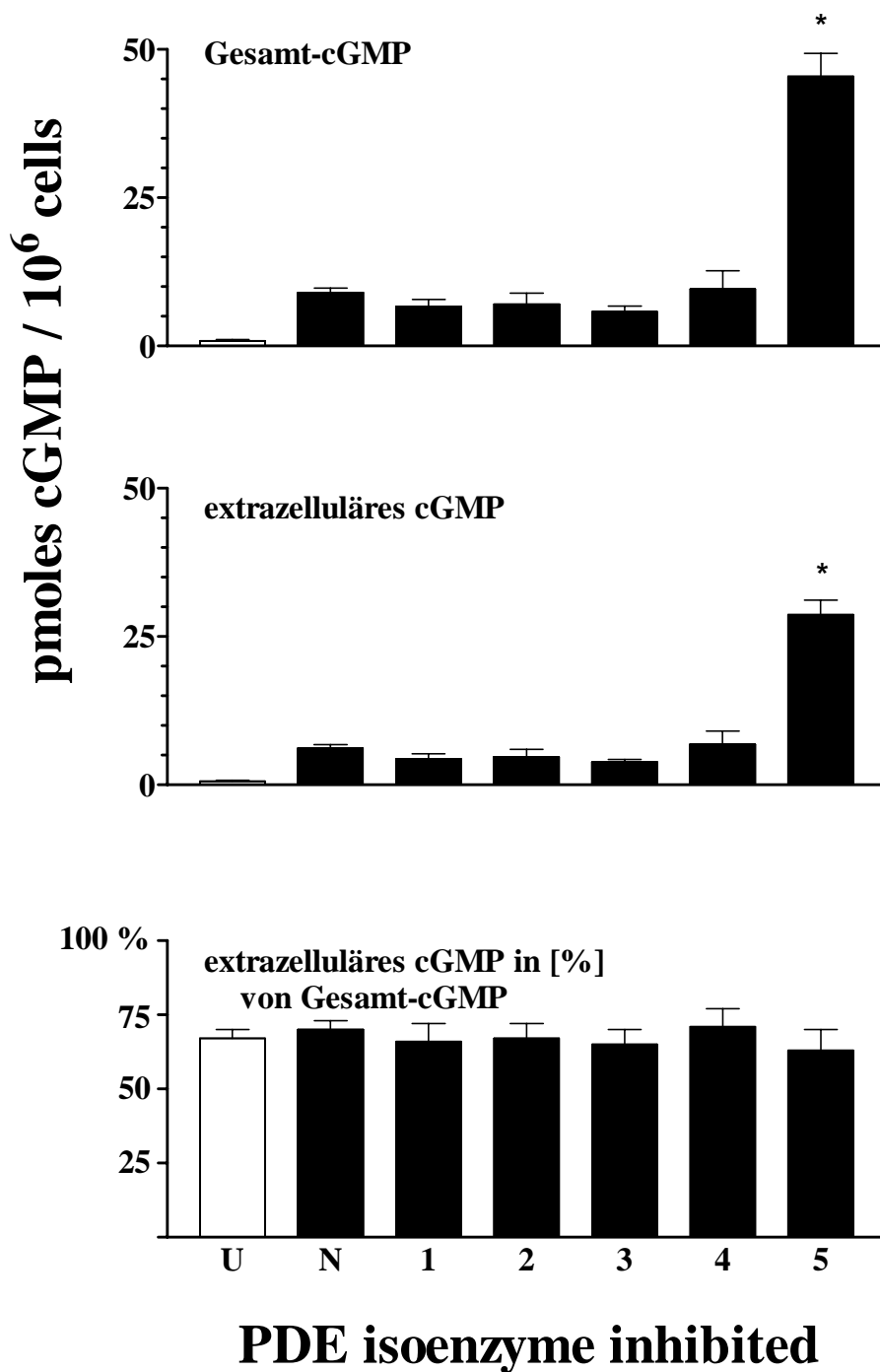


Abb. 14 b: Intra- und extrazelluläres cGMP in BEAS-2B

Nach Inkubation von 15 Minuten mit Inhibitoren der PDE1 (Vinpocetin 100 μ M), 2 (EHNA 100 μ M), 3 (Motapizon 1 μ M), 4 (Rolipram 10 μ M) und 5 (Zaprinast 10 μ M), Stimulation mit SNP 10 μ M für 30 Minuten. Für extrazelluläres und gesamtes cGMP gilt: Signifikante Erhöhung im Vergleich mit unbehandelten Zellen (U). Inhibition von PDE1, 2, 3 oder 4 führt nicht zu einer signifikanten Änderung gegenüber nur stimulierten Zellen (N). Einsatz von Zaprinast (PDE5-Inhibitor) bewirkt eine zusätzliche signifikante Steigerung (*). Die unterschiedliche Behandlung der Zellen blieb ohne signifikanten Einfluß auf den prozentualen Anteil des extrazellulär nachweisbaren cGMP. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

3.1.6 Einfluß von Probenicid auf cAMP und cGMP

Die humane Epithelzelllinie BEAS-2B wurde bezüglich der Wirkung von Probenicid auf intra- und extrazelluläres cAMP bzw. cGMP hin untersucht. Die Zellen wurden mit Probenicid 1mM für 15 Minuten vorbehandelt. Vor der Bestimmung von cAMP dann eine Inkubation mit Rolipram und eine Stimulation mit Forskolin. Die cGMP-Messung wurde nach einer Inkubation mit Zaprinast und einer Stimulation mit SNP durchgeführt.

Die so beeinflussten Zellen wurden mit Probenicid unbehandelten Zellen verglichen. Die angegebenen Gesamtmengen von cAMP und cGMP ergaben sich aus der jeweiligen Summe der intra- und extrazellulären Bestimmungen.

Intra- und extrazelluläres cAMP unter Probenicid-Einfluß

Ohne Probenicid zeigten die Zellen ein Gesamt-cAMP von 165 ± 14.9 , mit intrazellulär 110.5 ± 11.6 und extrazellulär 54.5 ± 7.2 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. Dies entspricht einer Verteilung von intrazellulär 67 % und extrazellulär 33 % des Gesamt-cAMP bezogen auf die Mittelwerte. Unter Anwendung von Probenicid reduzierte sich das Gesamt-cAMP auf 89.1 ± 15.8 , mit intrazellulär 75.2 ± 8.1 und extrazellulär 8.9 ± 2.3 pmol cAMP/ 10^6 Zellen. Bezogen auf die Mittelwerte erhöhte sich damit der intrazelluläre Anteil auf 91 % und der extrazelluläre Anteil verminderte sich auf 9 %. (Mittelwerte \pm SEM, mind. n=4), (Abb. 15)

Intra- und extrazelluläres cGMP unter Probenicid-Einfluß

Das Gesamt-cGMP in Abwesenheit von Probenicid betrug 45.5 ± 3.9 , mit intrazellulär 16.8 ± 1.4 und extrazellulär 28.7 ± 2.4 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Dies bedeutete eine Aufteilung des Gesamt-cGMP in intrazellulär 37 % und extrazellulär 63 % bezogen auf die Mittelwerte.

In Gegenwart von Probenicid verminderte sich die gesamte cGMP-Menge auf 25.0 ± 2.1 , mit intrazellulär 18.8 ± 1.6 und extrazellulär 6.3 ± 1.9 pmol cGMP/ 10^6 Zellen. Auf die Mittelwerte bezogen erhöhte sich damit der intrazelluläre Anteil auf 75 % und der extrazelluläre Anteil reduzierte sich auf 25 %. (Mittelwerte \pm SEM, mind. n=4), (Abb. 16)

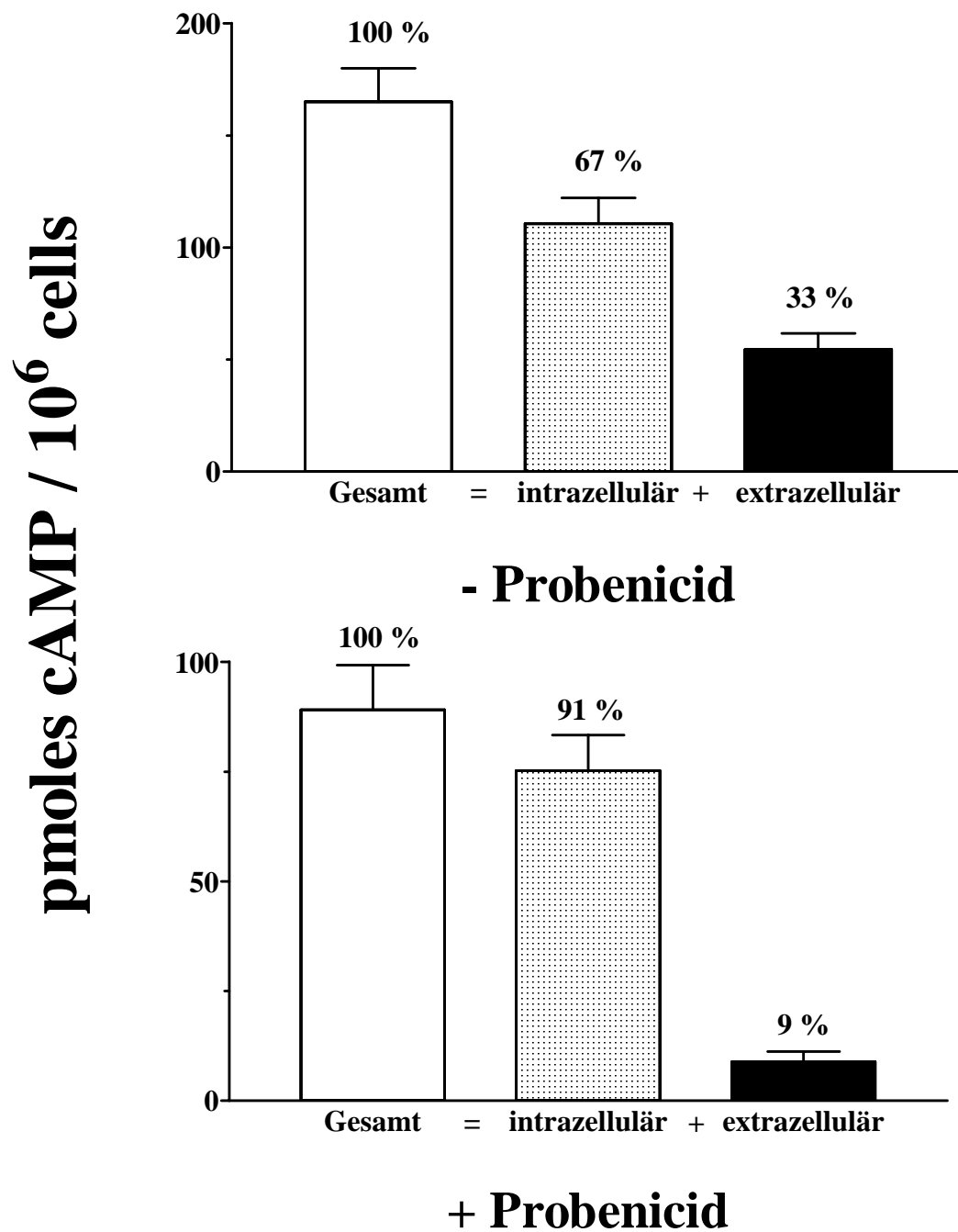


Abb. 15: cAMP-Veränderungen durch Probenicid in BEAS-2B

Vergleich von Zellen mit und ohne Vorinkubation von Probenicid 1 mM für 15 Minuten bei Inkubation mit Rolipram 10 μ M (PDE4-Inhibitor) für 15 Minuten und Stimulation mit Forskolin 1 μ M für 30 Minuten. Signifikante Zunahme des intrazellulären Anteils in Gegenwart von Probenicid. (Mittelwerte \pm SEM, mind. n=4)

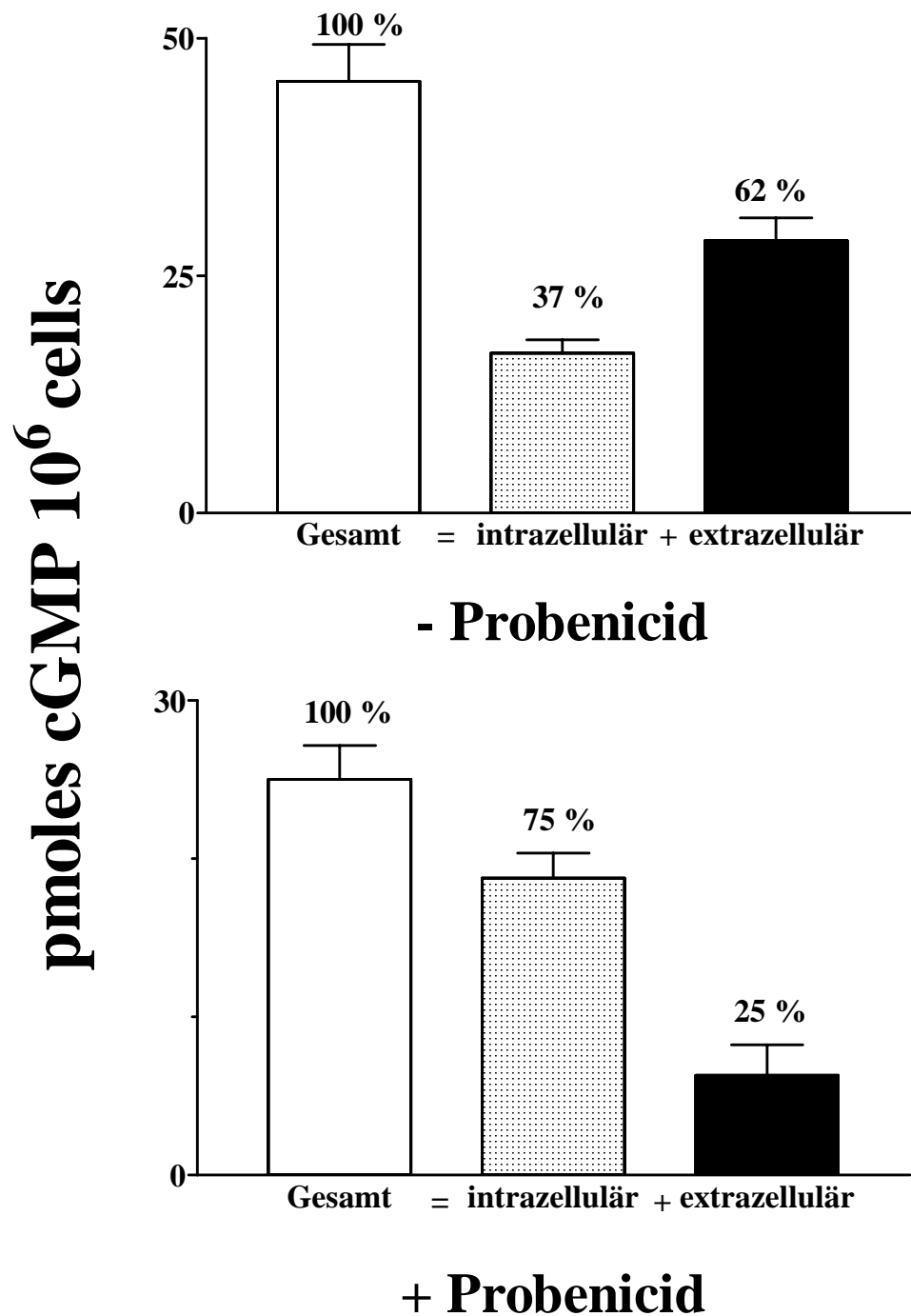


Abb. 16: cGMP-Veränderungen durch Probenicid in BEAS-2B

Vergleich von Zellen mit und ohne Vorinkubation von Probenicid 1 mM für 15 Minuten bei Inkubation mit Zaprinast 10 μ M (PDE5-Inhibitor) für 15 Minuten und Stimulation mit SNP 100 μ M für 30 Minuten. In Gegenwart von Probenicid signifikante Zunahme des intrazellulären Anteils. (Mittelwerte \pm SEM, mind. n=4)

3.2 Aktivität der PDE-Isoenzyme in hAEC, pAEC und BEAS-2B

In Zellsatzen wurde die Hydrolyse der zyklischen Nukleotide in Gegenwart von PDE-Inhibitoren gemessen. Der PDE-Assay erlaubt dabei im Gegensatz zu radioimmunologischen Messungen der zyklischen Nukleotide die direkte Bestimmung der PDE-Isoenzymaktivität bei Zugabe einer definierten Menge an exogenem cAMP bzw. cGMP. (Tab. 2 a-c und Abb. 17)

Hydrolyse zyklischer Nukleotide [nmol x min⁻¹ x mg protein⁻¹]

Tab. 2 a:

		hAEC	
		cAMP	cGMP
Gesamt-Hydrolyse		0.90 ± 0.04	0.58 ± 0.04
Kontrolle		0.25 ± 0.09	0.01 ± 0.03
EHNA	100 µM	(±)	0.56 ± 0.02
Motapizon	1 µM	0.82 ± 0.05	(±)
Rolipram	10 µM	0.58 ± 0.03	(±)
Zaprinast	10 µM	(±)	0.10 ± 0.06
PDE7-Aktivität		0.32 ± 0.08	
Gesamt-Hydrolyse-[+]		(±)	0.62 ± 0.12
Vinpocetin	100 µM	(±)	0.41 ± 0.04

Tab. 2 b:

		pAEC	
		cAMP	cGMP
Gesamt-Hydrolyse		1.81 ± 0.16	3.04 ± 0.57
Kontrolle		0.51 ± 0.08	1.11 ± 0.20
EHNA	100 µM	(±)	2.90 ± 0.17
Motapizon	1 µM	1.70 ± 0.15	(±)
Rolipram	10 µM	0.77 ± 0.17	(±)
Zaprinast	10 µM	(±)	1.03 ± 0.14
PDE7-Aktivität		0.23 ± 0.11	
Gesamt-Hydrolyse-[+]		(±)	(±)
Vinpocetin	100 µM	(±)	2.92 ± 0.13

Hydrolyse zyklischer Nukleotide [nmol x min⁻¹ x mg protein⁻¹]

Tab. 2 c:

		BEAS-2B	
		cAMP	cGMP
Gesamt-Hydrolyse		9.31 ± 0.60	6.78 ± 0.90
Kontrolle		0.91 ± 0.03	100 ± 0.14
EHNA	100 µM	(±)	6.44 ± 0.40
Motapizon	1 µM	9.09 ± 0.32	(±)
Rolipram	10 µM	2.62 ± 0.53	(±)
Zaprinast	10 µM	(±)	1.09 ± 0.05
PDE7-Aktivität		1.79 ± 0.49	
Gesamt-Hydrolyse-[+]		(±)	(±)
Vinpocetin	100 µM	(±)	6.43 ± 0.32

Tabelle 2 a-c: Hydrolyse von cAMP und cGMP in Gegenwart von PDE-Inhibitoren

Bestimmung der Hydrolyse im Zellysat von hAEC, pAEC und BEAS-2B im PDE-Assay. Die PDE-unabhängige Hydrolyse in Gegenwart von IBMX 100 µM (unspezifischer PDE-Inhibitor) wurde als Kontrolle gemessen. EHNA und Motapizon (PDE2- und PDE3-Inhibitor) blieben ohne signifikanten Effekt. Die Hemmung von PDE4 (Rolipram) und PDE5 (Zaprinast) verminderte die Hydrolyse in allen drei Zelltypen signifikant. Aus der Differenz der cAMP-Hydrolyse in IBMX und Rolipram behandelten Lysaten wurde die PDE7-Aktivität berechnet. In Gegenwart von 1.25 mM CaCl₂ und 100 µM Calmodulin gemessene Werte ergaben die Gesamt-Hydrolyse-[+], die nur in hAEC von der Gesamt-Hydrolyse signifikant verschieden war. Vinpocetin (PDE1-Inhibitor) reduzierte die Gesamt-Hydrolyse-[+] nur in hAEC signifikant. Das Symbol (±) zeigt an, daß die gemessenen Werte von der Gesamt-Hydrolyse nicht signifikant verschieden waren. (Mittelwert ± SEM, mind. n=5)

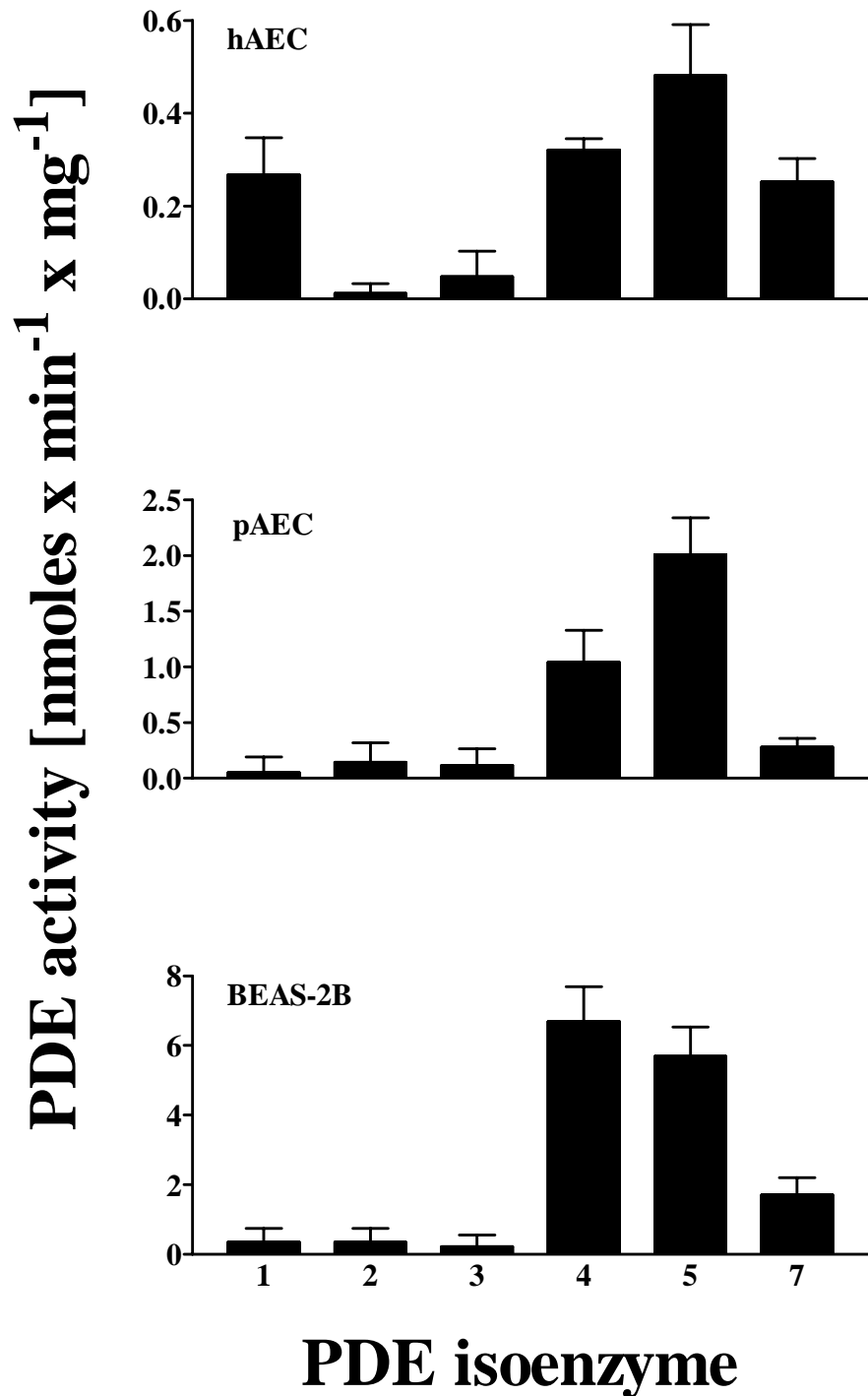


Abb. 11: Aktivität der PDE-Isoenzyme in Atemwegsepithelzellen

Berechnung der Isoenzym-Aktivität aus der Differenz zwischen Gesamt-Hydrolyse und Hydrolyse in Gegenwart von spezifischen PDE-Inhibitoren (s. Tabelle 2 a-c). Aktivität von PDE4, PDE5 und PDE7 in allen drei Zelltypen. In hAEC zusätzlich Nachweis von Calcium/Calmodulin-stimulierter PDE1. (Mittelwert \pm SEM, mind. n=5)

4. Diskussion

4.1 Identifizierung der PDE-Isoenzyme in Atemwegsepithelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden primär isolierte Atemwegsepithelzellen vom Menschen (hAEC) und vom Schwein (pAEC) sowie die humane Epithelzelllinie BEAS-2B untersucht. Der Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin und der Guanylatzyklase-Aktivator Nitroprussidnatrium (SNP) induzierten in intakten Zellen eine Erhöhung der zyklischen Nukleotide. Durch Vorinkubation mit selektiven PDE-Inhibitoren konnte eine weitere Steigerung erreicht werden. Bei allen drei Zelltypen gelang dies für cAMP mit Rolipram (PDE4-Inhibitor) und für cGMP mit Zaprinast (PDE5-Inhibitor). Zusätzlich zeigte sich in hAEC eine signifikante cGMP-Zunahme durch den PDE1-Inhibitor Vinpocetin.

Als weiterer Schritt erfolgte die Bestimmung der Phosphodiesterasen-Aktivität in Zellysaten. Hierbei wurde die Hydrolyse exogen zugeführter zyklischer Nukleotide in Gegenwart der PDE-Inhibitoren gemessen. Alle untersuchten Zellen ergaben eine deutliche Reduktion des Abbaus von cAMP durch Rolipram und von cGMP durch Zaprinast. Bei Anwesenheit von Kalzium und Kalmodulin ließ sich im Lysat von hAEC eine Zunahme der hydrolytischen Aktivität für cGMP nachweisen. Diese konnte durch Vinpocetin signifikant vermindert werden.

Die Kombination der Studien an intakten Bronchialepithelzellen und deren Zellysaten ergibt folgendes Bild: In hAEC, pAEC und BEAS-2B läuft der Hauptabbauweg für cAMP über PDE4 und für cGMP über PDE5. In primär isolierten humanen Atemwegsepithelzellen erfolgt ca. 20 % der cGMP-Hydrolyse zusätzlich durch die Ca^{2+} /CaM-abhängige PDE1.

Es zeigt sich eine auch von Rolipram nicht zu beeinflussende Eliminierung von cAMP in allen Zellen mit einem Anteil von ca. 30 % an der Gesamt-Hydrolyse. Dieser Rolipram-insensitive, spezifische Abbau von cAMP spricht für das Vorhandensein einer PDE7 (52). In Ermangelung eines selektiven Inhibitors für diese Familie ist eine eindeutige Verifizierung mit pharmakologischen Methoden nicht möglich. Durch Einsatz der PCR-Analytik gelang es bei weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe in allen verwendeten Atemwegsepithelzellen (hAEC, pAEC und BEAS-2B) PDE7-mRNA nachzuweisen (88).

4.2 Verfahren der Isoenzymmuster-Bestimmung

Das Interesse an einer Aufschlüsselung der Phosphodiesterasen-Verteilung nach Gewebe- und Zelltypen ist wohlbegründet. Zum einen eröffnen sich damit neue Einblicke in Steuerungsvorgänge der Zellen und zum anderen könnten sich direkte therapeutische Konsequenzen ergeben. Ein klassischer, pharmakologischer Ansatz ist die Analyse von Konzentrationsänderungen der betroffenen Substrate und Produkte nach Anwendung von Inhibitoren auf die zu untersuchenden Enzymsysteme. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von PDE-Enzymhemmern auf die zyklischen Nukleotide in Bronchialepithelzellen untersucht.

Selektivität der PDE-Inhibitoren

Grundsätzlich ist die Spezifität von PDE-Inhibitoren in hohem Ausmaß konzentrationsabhängig. Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren werden in den gewählten Konzentrationen als selektiv für die einzelnen PDE-Isoenzymfamilien betrachtet (84). In gleicher oder höherer Dosierung wurden sie bereits von anderen Autoren in einer Reihe von Studien an verschiedenen zellulären Systemen eingesetzt (85, 86).

Die Quantifizierung einer PDE7-Aktivität in den untersuchten Zellysaten ist nicht unproblematisch. Ihre Berechnung als Differenz der cAMP-Hydrolyse in Gegenwart von IBMX und Rolipram beinhaltet mehrere Ungenauigkeiten. Selbst mit der gewählten IBMX-Konzentration von 100 μ M kann nicht davon ausgegangen werden, daß der gesamte Umsatz durch PDE7 blockiert wird (87). Insofern könnte ihr Anteil an der Gesamt-Hydrolyse unterschätzt werden. Zusätzlich inhibieren 10 μ M Rolipram trotz der Definition als Rolipram-insensitive Enzymgruppe ca. 10 % des PDE7-Umsatzes (78). Ungeachtet dieser Fehlerquellen muß aber ein substantieller Anteil dieser Familie am cAMP-Abbau angenommen werden. Weitere Hinweise für die Existenz einer PDE7 sind der Nachweis der zugehörigen mRNA in humanen Bronchialepithelzellen und im Lungengewebe von Mäusen (84, 88).

Zyklische Nukleotide als Parameter der PDE-Aktivität

Die zentrale Bedeutung von cAMP und cGMP für eine Reihe von wichtigen intrazellulären Signaltransduktionswegen ist bekannt. Experimentell lassen sich viele Funktionen in unterschiedlichen zellulären Systeme durch eine Beeinflussung der zyklischen Nukleotide steuern. Allerdings ist eine direkte Korrelation zwischen der Konzentrationsänderung von cAMP bzw. cGMP und der beobachteten Veränderung der untersuchten Zielgröße nicht immer gegeben.

Die transformierte epitheliale Zelllinie CF-T43 weist eine homozygote Mutation des $\Delta F508$ CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) auf. Es handelt sich dabei um einen cAMP-abhängigen Cl⁻-Kanal, der auch im Rahmen der Mukoviszidose eine verminderte Leitfähigkeit besitzt. Kelley et al. zeigten in diesen Zellen eine Erhöhung des residualen Chlorid-Effluxes durch den PDE3-Inhibitor Milrinon (89). Eine signifikante Zunahme von intrazellulärem cAMP war dabei nicht zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu führte der unselektive PDE-Inhibitor IBMX zwar zu einer deutlichen Steigerung des cAMP, bewirkte aber nur eine geringe Aktivierung der Cl⁻-Kanalleitfähigkeit.

Die Autoren der o. g. Studie erklärten diesen scheinbaren Widerspruch mit einer Kompartimentalisierung der PDE-Isoenzyme innerhalb der Zelle. So könnte die PDE3 trotz ihres relativ kleinen Anteils an der gesamten Phosphodiesterasen-Aktivität, durch ihre Lokalisation an der Zellmembran eine Hauptrolle in der Regulation der Chlorid-Leitfähigkeit spielen (85). Es muß kritisch angemerkt werden, daß Milrinon in o. g. Untersuchung in der als sehr hoch zu wertenden Konzentration von 100 μ M eingesetzt wurde, so daß unspezifische Effekte des Inhibitors nicht sicher auszuschließen sind (84).

Bei Endothelzellen des Schweines induzierte H₂O₂ eine starke Erhöhung ihrer Permeabilität (132). Dieser Effekt konnte durch eine Kombination aus Adenylatzyklase-Aktivierung und PDE3/4-Inhibition vollständig antagonisiert werden. Die Analyse des PDE-Isoenzyommusters zeigte u. a. hohe Aktivitäten der PDE3 und 4. Auch in dieser Studie war keine eindeutige Abhängigkeit der endothelialen Permeabilität von der intrazellulären cAMP-Konzentration festzustellen. Die Wirkung von H₂O₂ konnte bereits durch PDE-Inhibitorkonzentrationen aufgehoben werden, die noch keine meßbare Änderung des Gesamt-cAMP bewirkten.

Bestimmte zelluläre Zielgrößen sind durch Inhibition der Phosphodiesterasen steuerbar. Diese Vorgänge werden über intrazelluläre Konzentrationsänderungen der zyklischen Nukleotide geregelt. Aufgrund der differenzierten Verteilung der einzelnen PDE-Isoenzyme in den

subzellulären Fraktionen wird aber u. U. die Gesamtmenge an cAMP oder cGMP in der Zelle nur wenig beeinflusst.

Um das exakte Isoenzymmuster einer Zelle festlegen zu können, reicht es zusammenfassend nicht aus, indirekte Parameter wie z. B. die Cl⁻-Kanalleitfähigkeit bzw. die endotheliale Permeabilität und ihre Beeinflussbarkeit durch PDE-Inhibitoren zu bewerten. Eine eindeutige quantitative Aussage wird nur durch die unmittelbare Messung der PDE-Isoenzymaktivitäten, wie sie in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, möglich. Im Umkehrschluß darf aber bei einem niedrigen Anteil an der PDE-Gesamtaktivität nicht sofort auch eine untergeordnete funktionelle Bedeutung eines bestimmten subzellulären Abbauweges angenommen werden.

Biochemische und molekularbiologische Methoden

Die ursprüngliche Nomenklatur der Phosphodiesterasen orientierte sich nur an ihren regulatorischen Eigenschaften und der Substratspezifität. Die Einführung neuer Methoden erlaubte die Entschlüsselung der Proteinprimärstruktur sowie die Sequenzierung der zugehörigen cDNA und mRNA. Diese Erkenntnisse führten zur aktuellen PDE-Klassifikation, die auf einer Kombination aus pharmakologischen, biochemischen und molekularbiologischen Kriterien basiert (52).

Innerhalb der einzelnen Familien werden immer weitere Gene identifiziert. Von der PDE1 sind u. a. mehrere Isoenzyme in Herz, Hirn und Lungengewebe bekannt (51). Trotz gemeinsamer Merkmale zeigen sich prinzipielle Unterschiede bezüglich Substratspezifität und Kalmodulin-Sensitivität. Eine Analyse der Aminosäure-Sequenz klärte, daß bestimmte Enzyme nur die gewebespezifische mRNA-Splice Variante desselben Gens darstellen, während andere Produkte verschiedener, homologer Gene sind (53).

Reinhardt et al. studierten das Verteilungsmuster von PDE3-mRNA in der Entwicklung von Ratten (92). Im Bronchialepithel der Embryos (20. Tag) wiesen sie PDE3B mRNA nach. In adulten Tieren wurde dieser Nachweis nicht geführt. Im ebenfalls untersuchten Neuroepithel war nach anfänglich hohen Konzentrationen während der intrauterinen Entwicklung ein starker Abfall der Genexpression in erwachsenen Ratten zu verzeichnen.

In allen untersuchten Geweben von Mäusen, u. a. auch in der Lunge, konnte PDE7A2-mRNA detektiert werden (84). Das stärkste Signal zeigte sich in Skelettmuskelzellen, sowie B- und T-Zelllinien. Die Bestimmung der PDE7-Enzymaktivität ergab aber lediglich in der T-Zelllinie

meßbare Werte. Für die beiden anderen Zelltypen gelang der Nachweis auf der Proteinebene nicht. Bloom und Beavo interpretierten diese Unterschiede als Ausdruck verschiedener zellspezifischer Regulationsmechanismen. Eine hohe Expression von mRNA schließt nicht aus, daß nur eine geringe Translationrate vorliegt, das gebildete Enzym inaktiv oder nicht stabil ist (84).

Robichaud et al. kombinierten die Bestimmung der Enzymaktivität mit dem Isoenzym-Nachweis durch Reverse Transcriptase-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) (95). Sie zeigten, daß in der Alveolarepithel-Zelllinie A549 die Hydrolyse der zyklischen Nukleotide durch PDE4 sowie in geringerem Umfang durch PDE1 und 5 geleistet wird. Innerhalb der PDE-Familie 4 konnten darüber hinaus die Isoenzyme 4A und 4D identifiziert werden.

Keine der verfügbaren Methoden ist bei alleiniger Anwendung als erschöpfend und eindeutig anzusehen. Ob eine bestimmte Isoenzymgruppe enzymatisch aktiv ist, läßt sich nur durch die Untersuchung der familienspezifischen Hydrolyse-Eigenschaften verifizieren. Der bloße Nachweis des Proteins ist nicht ausreichend. Welche Genprodukte einer PDE-Familie aber tatsächlich exprimiert werden, ist nur mit molekularbiologische Methoden zu erfassen. Zukünftige Studien müssen also verstärkt auf mehreren Ebenen ansetzen, um die verschiedenen Aspekte zu klären.

4.3 Atemwegsepithelzellen als Untersuchungsmaterial

Um die Aussagefähigkeit der Experimente zu erhöhen, ist die Verwendung von humanen Zellen (hAEC) wünschenswert. Dieser Anspruch wurde allerdings durch die Verfügbarkeit des Sektionsmaterials limitiert. Um die notwendige Anzahl an Versuchen durchführen zu können, mußten auch primär isolierte Zellen vom Schwein (pAEC) und die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B eingesetzt werden. Damit stellt sich die Frage nach der prinzipiellen Vergleichbarkeit von Befunden, die an verschiedenen Spezies erhoben wurden. Zusätzlich ist der Einfluß einer virusinduzierten Transformationen auf die Stoffwechselcharakteristika von immortalisierten Zellen zu diskutieren.

Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen humanen Ursprungs auffälliger als diejenigen zwischen BEAS-2B und pAEC. Dies gilt sowohl bezogen auf die hydrolytische Gesamtaktivität für zyklische Nukleotide als auch für das exakte Isoenzymprofil.

Rousseau et al. wiesen im Epithel von Rindertracheae durch DEAE Anionenaustausch-Chromatographie unterschiedliche Aktivitäten der PDE1-5 nach (85). Die Analyse erfolgte nach Auftrennung der Zellfraktionen mittels HPLC. Sie identifizierten die Phosphodiesterasen-Familien 1, 2, 4 und in geringerem Maße 5 als dominierend im Zytosol und die PDE3 als nur Membran-gebunden vorkommend. Insgesamt sind die Ergebnisse dieser Studie aber kritisch zu betrachten. Die gesamte Phosphodiesterasen-Aktivität wurde in einem breiten, relativ wenig strukturierten Peak eluiert. Die anschließende Zusammenfassung verschiedener Fraktionen und ihre Zuordnung zu bestimmten PDE-Isoenzymgruppen erscheint zumindest in Teilen willkürlich. Auch über den jeweiligen Anteil der Isoenzyme an der Gesamthydrolyse wurden keine Angaben gemacht. Der Nachweis von PDE3 gelang überdies nur mit der sehr hohen Konzentration von Inodilan 50 μ M (93). Auf einen selektiven Inhibitor zur Bestimmung der PDE2 wurde verzichtet. Die Untersucher werteten die Beeinflussbarkeit durch exogen zugeführtes cGMP als ausreichenden Beleg für die Existenz dieser Isoenzymfamilie.

Im Rahmen der Mukoviszidose-Forschung mit Studien der Elektrolytleitfähigkeit führten Kelley et al. Messungen an den humanen Atemwegsepithelzelllinien CF-T43 und Calu-3 durch (89, 90). Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Verhalten nach Applikation von PDE-Inhibitoren. Rolipram (PDE4) bewirkte in beiden Zelltypen eine starke Zunahme des cAMP. In Calu-3-Zellen konnte diese auch durch den PDE3-Inhibitor Milrinon erreicht und durch IBMX sogar noch wesentlich gesteigert werden. Im Gegensatz dazu hatte Milrinon in CF-T43-Zellen nur einen sehr geringen Einfluß auf den cAMP-Metabolismus. Beide Zelllinien zeigten aber übereinstimmend, daß der Chlorid-Efflux sich durch Rolipram nicht steigern ließ. Die o. g. Studien liefern Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung des PDE3-Abbauweges in den untersuchten zellulären Systemen. Gleichzeitig zeigen sich aber eindeutige Differenzen bezüglich der Beeinflussbarkeit durch Phosphodiesterase-Inhibitoren. Prinzipiell scheinen auch Atemwegsepithelzelllinien einer Spezies nur eingeschränkt vergleichbar zu sein. Inwieweit die Unterschiede durch verschiedene Immortalisierungsmethoden oder als Folge der Δ F508 CFTR-Mutationen auftreten, ist noch zu klären.

Experimente an der Trachea von Ratten zeigen, daß die Mukusproduktion durch PDE3-Inhibition nicht zu beeinflussen ist. Mit Hilfe des Inhibitors Rolipram erfolgte der Nachweis, daß diese wichtige Eigenschaft überwiegend durch die PDE4-Familie gesteuert wird (91).

In Zellhomogenaten, gewonnen aus humanem Atemwegsmaterial, konnten die PDE1-5 nachgewiesen werden. Trotz hoher Aktivitäten der Isoenzym-Familien 4 und 5 blieb ihre

Inhibition ohne Effekt auf den in dieser Studie untersuchten inhärenten Tonus der glatten Muskulatur. Rabe et al. vermuteten deshalb eine bevorzugte Lokalisation der PDE4 und 5 im nicht-muskulären Gewebe der Bronchien (86). Eine weitere zellspezifische Differenzierung wurde in dieser Arbeit aber nicht vorgenommen.

Eine unmittelbare Übertragbarkeit der an Zelllinien oder verschiedenen Spezies gemachten Beobachtungen ist nicht als gegeben anzunehmen. Dies ist aber kein spezielles Phänomen der Untersuchungen am Bronchialsystem, sondern ein generelles Problem beim Vergleich biologischer Systeme.

4.4 Export zyklischer Nukleotide

cAMP und cGMP im extrzellulären Kompartiment

Die Eliminierung der gebildeten zyklischen Nukleotide wird durch zwei Mechanismen gesteuert. Zum einen über die Hydrolyse durch Phosphodiesterasen und zum anderen durch Export in den extrazellulären Raum (97). Die große intrazelluläre Bedeutung von cAMP und cGMP als „second messenger“ ist sehr gut untersucht. Welche Funktionen aber ihre extrazelluläre Freisetzung hat, wird intensiv diskutiert. Mehrere Hinweise für eine Relevanz auch im Rahmen der interzellulären Kommunikation sind beschrieben (129, 130, 131).

Alle bisher untersuchten Zelltypen zeigten einen Efflux von zyklischen Nukleotiden mit den Eigenschaften eines aktiven Transportes (96). Dieser konnte in Erythrozyten durch den Mediator Prostaglandin A₁ gehemmt sowie durch ANP (atrial natriuretic peptide) in Endothelzellen und Nierenepithelzellen gesteigert werden (98, 99, 100).

Auf der Oberfläche von HeLa-Zellen identifizierten Kübler et al. eine cAMP-abhängige Proteinkinase (ecto-cAMP-PK) (101). Die Aktivität des Enzyms wurde durch die Verfügbarkeit von extrazellulärem cAMP bestimmt. Intrazelluläre Konzentrationsänderungen blieben dagegen ohne Effekt.

Bestimmte Klassen von Chlorid-Kanälen in Nierenepithelzellen und Natrium-Kanälen in Kardiomyozyten regulieren ihre Leitfähigkeit über Rezeptoren für zyklische Nukleotide auf der Zelloberfläche (102, 103). Darüber hinaus fielen erhöhte extrazelluläre cGMP-Konzentrationen im Rahmen von verschiedenen kardiovaskulären und malignen

Erkrankungen auf. In diesem Zusammenhang ist bereits die Verwendung von cGMP als diagnostischer Marker vorgeschlagen worden (104).

Effekte von Probenicid

Die Ausschleusung von cAMP und cGMP aus der Zelle läßt sich als nicht sättigbarer, Energie- und Temperatur-abhängiger Transport charakterisieren (96). Ein zusätzliches Merkmal ist die Probenicid-Sensitivität (105). Als Medikament wurde Probenicid zur Verlängerung der intravasalen Verweildauer von β -Lactam Antibiotika, insbesondere Penicillin eingesetzt. Das Wirkprinzip besteht im kompetitiven Antagonismus an einem Transporter für organische Anionen (106). Probenicid hemmt dadurch unspezifisch nicht nur die Ausscheidung von Penicillin über die Niere, sondern auch den Export von zyklischen Nukleotiden nach extrazellulär an allen bisher untersuchten Geweben.

In einer Studie beschrieben Geary et al. die Freisetzung von cAMP und cGMP durch das Epithel der Atemwege (97). Ca. 27 % des gebildeten cAMP, sowie 60 % des cGMP wurden von den Zellen freigesetzt. Dieser Vorgang verlief für beide Substanzen mit einer vergleichbaren Kinetik, wobei der untersuchte „Carrier“ zu cGMP lediglich eine höhere Affinität zeigte. Der prozentuale Anteil der Gesamtmenge an zyklische Nukleotiden, der exportiert wurde, war konstant. Der Transporter war also in den gewählten Konzentrationsbereichen nicht zu sättigen. Diese Befunde decken sich weitgehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die zusätzlich den Einfluß von PDE-Inhibitoren erfaßte. Sie bewirkten alle intra- und extrazellulär jeweils proportionale Erhöhungen von cAMP und cGMP. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die bei verschiedenen PDE-Inhibitoren festgestellte intrazelluläre Steigerung nur ein Artefakt infolge eines geänderten Exportverhaltens darstellte. Geary et al. konnten in der oben zitierten Untersuchung das Freiwerden von zyklischen Nukleotiden aus den Zellen durch Probenicid 10 mM fast vollständig hemmen. Parallel dazu war eine entsprechende Zunahme der intrazellulären Konzentration zu verzeichnen.

An der Zelllinie BEAS-2B gelang es nur teilweise, diese Wirkung von Probenicid nachzuvollziehen. Trotz Austestung aller gängigen Lösungsmittel konnte Probenicid nur bis maximal 1mM eingesetzt werden. Auch mit dieser Konzentration ließ sich noch eine deutliche Verschiebung vom extrazellulären ins intrazelluläre Kompartiment erreichen. Insgesamt war unter den gewählten Bedingungen aber auch die Gesamtmenge von cAMP und cGMP um

durchschnittlich fünfzig Prozent reduziert. Diese Abnahme dürfte auf zusätzlichen Interaktionen des Probenicids beruhen. Mögliche Angriffspunkte solcher unspezifischen Wirkungen sind u. a. die Adenylat- bzw. Guanylatzyklase.

Das System von Geary et al. arbeitete mit polarisierten Zellen und erlaubte daher eine zusätzliche Differenzierung der Freisetzung nach apikal und basolateral. Zellschädigende Wirkungen des Probenicids konnten in diesem Modell durch eine Bestimmung des transepithelialen Widerstandes ausgeschlossen werden.

Eine Messung der LDH-Freisetzung aus BEAS-2B ergab in der hier vorgelegten Studie eine Steigerung auf maximal 9.6 % der Gesamt-LDH im Vergleich zu einem Kontrollwert von 2.4 ± 0.6 %. Alle anderen verwendeten Substanzen bzw. deren Lösungsmittel führten dagegen nicht zu einer signifikanten Zunahme der LDH. Allerdings kam Probenicid in ähnlichen Konzentrationsbereichen bei verschiedenen Studien zum Einsatz, ohne das toxische Effekte berichtet wurden (106, 107, 108).

4.5 Phosphodiesterasen als Angriffspunkte therapeutischer Interventionen

Das klassische klinische Beispiel für die Potenz des pharmakologischen Prinzips der PDE-Inhibition sind die Methylxanthine mit ihrem Hauptvertreter Theophyllin. Es ist ein seit Jahrzehnten bewährter Bestandteil der Therapie des Asthma bronchiale und anderer obstruktiver Atemwegserkrankungen. Neben den erwünschten bronchodilatativen und antiinflammatorischen Effekten können aber schwerwiegende kardiale und zentralnervöse Nebenwirkungen auftreten. Die insgesamt geringe therapeutische Breite ist als Folge der unspezifischen Hemmung der PDE-Isoenzyme in allen Geweben zu werten. Der logische Weg zu einer besser verträglichen Medikation führt daher über die Entwicklung von selektiveren Inhibitoren.

Klinische Studien mit Rolipram bestätigten dessen antiobstruktive und entzündungshemmende Wirkung, mußten aber wegen Nebenwirkungen (u. a. starkes Schwindelgefühl und Übelkeit) abgebrochen werden (51). Der neuere PDE4-Inhibitor CDP840 zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit aus, konnte aber lediglich die späte asthmatische Antwort nach Allergen-Exposition abschwächen, ohne direkte bronchodilatative Effekte zu zeigen (121). Um eine gleichzeitige Modulation der PDE4-Aktivität in der Bronchialmuskulatur und in

immunkompetenten Zellen ohne Beeinflussung der neuronalen PDE4 zu erreichen, müssen die geeigneten pharmakologischen Werkzeuge also noch entwickelt werden.

Zusätzlich zum Asthma bronchiale scheint die Hemmung der Phosphodiesterasen-Aktivität noch bei weiteren pulmonalen Krankheitsbildern erfolgversprechende Perspektiven zu eröffnen.

Das ARDS (Adult Respiratory Distress Syndrome) ist durch eine pulmonalvaskuläre Schrankenstörung mit Ausbildung eines eiweißreichen Lungenödems gekennzeichnet. Die erhöhte endotheliale Permeabilität ließ sich durch Rolipram sowohl an der isolierten Lunge als auch am Zellmodell günstig beeinflussen (5, 110, 111). Ob eine Komedikation aus PDE4-Inhibitor und Adenylatzyklaseaktivator (z. B. Prostazyklin) eine Reduktion der erhöhten extravasalen Flüssigkeitsansammlung bewirkt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen an Schocklungen-Patienten (112).

Auch in der Therapie der pulmonalen Hypertonie zeichnen sich sinnvolle Ansätze für den Einsatz von PDE-Inhibitoren ab. Die Inhalation von NO führt zu einer isolierten Vasodilatation in der Lungenstrombahn (113). Da NO via Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase wirkt, ist eine Kombination mit PDE5-Inhibitoren naheliegend. Im Tierversuch am Schaf konnte durch Zaprinast die Halbwertszeit der NO-Wirkung verlängert und eine synergistische Senkung des pulmonalarteriellen Mitteldrucks erreicht werden (114, 115).

Im klinischen Einsatz bewährt haben sich bereits PDE3-Inhibitoren. Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz profitieren von ihrer positiv inotropen und Nachlast-senkenden Wirkung (109). Zusammen mit Dobutamin zeigt sich ein additiver Effekt auf den Herzindex, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und die Herzfrequenz (122). Aufgrund der z. T. schweren Nebenwirkungen werden PDE3-Hemmer bisher jedoch nur kurzfristig, z. B. in der Überbrückungsphase bis zu einer Herztransplantation eingesetzt.

Durch die Hemmung der PDE5 konnten in vitro und im Tierversuch aggregations- und gefäßproliferationshemmende Wirkungen erzielt werden (123).

Ein Medikament, welches auch außerhalb der Fachpresse für besonderes Interesse sorgt, ist Sildenafil. Ursprünglich zur Behandlung von Angina pectoris-Schmerzen entwickelt, wird es nun unter dem Handelsnamen Viagra zur oralen Therapie von Erektionstörungen unterschiedlicher Ätiologie eingesetzt. Sildenafil wirkt als kompetitiver Inhibitor der PDE5, die als die dominante Isonenzym-Familie im humanen Corpus cavernosum identifiziert wurde (124).

Aufgrund der zentralen Position der Phosphodiesterasen in verschiedenen Signaltransduktionswegen wird in zukünftigen Behandlungskonzepten das Interesse an ihrer Regulation stark zunehmen. Mit Hilfe neuer Untersuchungsmethoden wird sich die molekulare Basis mit Kenntnis der zell-, gewebe- und spezies-spezifischen Isoenzymverteilung ständig erweitern. Parallel dazu müssen superselektive Substanzen gefunden werden, die eine Umsetzung dieses Wissens in intelligentere Therapiestrategien ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist mit einer Prävalenz von 10 % bei Kindern und 5 % bei Erwachsenen eine der häufigsten chronisch pulmonalen Erkrankungen. Seit Jahrzehnten haben die Methylxanthine mit ihrem wichtigsten Vertreter Theophyllin in seiner Therapie einen bedeutenden Stellenwert. Als entscheidender Wirkmechanismus dieser Medikamente wurde die Hemmung der Phosphodiesterasen (PDE) erkannt. Eine Vielzahl von Untersuchungen belegt, daß die verschiedenen PDE-Isoenzyme in den einzelnen Gewebe- und Zelltypen höchst differenziert verteilt auftreten. Aufgrund der leider nur unspezifischen Inhibition der Phosphodiesterasen durch Theophyllin vereint es die bronchodilatativen und entzündungshemmenden Eigenschaften mit einer Reihe starker, seine Anwendung limitierende Nebenwirkungen.

Vor diesem klinischen Hintergrund ist das große Interesse an Phosphodiesterasen verständlich. Das Substrat der PDE sind die zyklischen Nukleotide. Sie spielen eine zentrale Rolle als „second messenger“ in intrazellulären Signaltransduktionswegen. Zusätzlich mehren sich die Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung von cAMP und cGMP auch im extrazellulären Kompartiment.

Die vorliegende Arbeit fokussierte auf die Untersuchung von primär isolierten Bronchialepithelzellen des Menschen (hAEC), des Schweines (pAEC) und der humanen, bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B. Ziel war die Identifizierung der Isoenzymfamilien, die in den genannten Zelltypen den Abbau der zyklischen Nukleotide leisten. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden selektive Inhibitoren der PDE-Familien in zwei sich ergänzenden methodischen Ansätzen verwendet. Mit einem Radio Immuno Assay (RIA) konnte in intakten Zellen nach Stimulation der Adenylat- bzw. der Guanylatzyklase und Inkubation mit verschiedenen PDE-Hemmern die Konzentrationsänderungen des endogenen cAMP und cGMP gemessen werden. Darüberhinaus wurde in Zelllysaten nach Zugabe einer definierten Menge an exogenen zyklischen Nukleotiden die vorhandene Enzymaktivität in Gegenwart von Inhibitoren im PDE-Assay direkt bestimmt.

Die Analyse der Ergebnisse beider Methoden ergab folgendes Bild: cAMP wurde überwiegend durch PDE4 und cGMP zum größten Teil durch PDE5 hydrolysiert. In hAEC konnte zusätzlich der Ca^{2+} /CaM-abhängigen PDE1 ein Anteil von durchschnittlich 20 % am Abbau von cGMP zugeordnet werden. In allen drei Zelltypen wies eine Rolipram-insensitive

Eliminierung von cAMP auf das Vorhandensein einer PDE7 hin. Der extrazelluläre Anteil von cAMP lag bei ca. 30 % und von cGMP bei ca. 60 % der jeweiligen Gesamtmenge an zyklischen Nukleotiden.

In weiteren Studien, die nicht Bestandteil dieser Promotionsarbeit sind, kamen molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Dadurch konnten zu den in Bronchialepithelzellen als funktionell bedeutsam identifizierten PDE-Familien die jeweils vorhandenen Gene und die gebildeten mRNA-Splice-Varianten identifiziert werden. Erst die Kombination von biochemischen und molekularbiologischen Ergebnissen erlaubt letztlich eine differenzierte Aussage über das exakte Isoenzymmuster einer Zelle.

Klinischer Ausgangspunkt der Überlegungen war die Notwendigkeit zur Entwicklung einer effektiveren Therapie von entzündlichen, obstruktiven Atemwegserkrankungen. Die Hemmung der Phosphodiesterasen hat sich prinzipiell bereits als ein gangbarer Weg erwiesen. Um eine gezielte und damit nebenwirkungsarme Medikation zu ermöglichen, ist die Erstellung von differenzierten PDE-Profilen für alle in dieses Krankheitsbild involvierten Zellen eine Grundvoraussetzung. In diesem Zusammenhang stellt die Untersuchung des Bronchialepithels also einen kleinen, aber notwendigen Schritt zu intelligenteren Therapiestrategien dar.

Aufgrund der großen Bedeutung der zyklischen Nukleotide für eine Vielzahl von Regulationsvorgängen scheint die Beeinflussung der Aktivität der Phosphodiesterasen noch weitere erfolgversprechende Behandlungskonzepte zu ermöglichen. Neben Asthma bronchiale liegen konkrete klinische Erfahrungen u. a. bei Mukoviszidose, pulmonaler Hypertonie, Lungenödem bei ARDS-Patienten, schwerer Herzinsuffizienz und erektiler Dysfunktion vor.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Wu, R., D. Smith. Continuous multiplication of rabbit tracheal epithelial cells in a defined hormone supplement media. *In vitro* 18: 800-812 (1982).
- (2) A. Doyle, J. B. Griffith, D. G. Newell (eds). *Cell tissue culture. Laboratory procedures* (1994).
- (3) Reddel, R. R., Y. Ke, B. I. Gerwin, M. G. McMenamin, J. F. Lechner, R. T. Su, D. E. Brash, J. B. Park, J. S. Rhim, C. C. Harris. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transformation via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 48: 1904-1909 (1988).
- (4) Suttorp, N., S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krüll, and T. Podzuweit. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme 2 for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am. J. Physiol.* 270: C778-785 (1996).
- (5) Stepling, H., R. Ferlinz. *Erkrankungen der Atemwege. Die Innere Medizin* (8. Auflage). Schattauer: 414-419 (1993).
- (6) Davies R. J., J. L. Devalia. Epithelial cells. *Brit. Med. Bulletin.* 48: 85-96 (1992).
- (7) Poulter L. W., C. M. Burke. Bronchial hyperactivity in the presence and absence of inflammation (A clue to asthma pathogenesis). 5th Vienna Asthma Forum. Springer: 17-31 (1994).
- (8) Costello J. The effects of theophylline on airway inflammation in asthma. 5th Vienna Asthma Forum. Springer: 151-162 (1994).
- (9) Pauwels R. The Role of airway epithelium in asthma: from cover to culprit. *Eur Respir Rev.* 4: 23, 380-381 (1994).

- (10) Busse W. W. The Role of Respiratory Infections in Airway Hyperresponsiveness and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 150: 77-79 (1994).
- (11) Stewart J. Levine. Bronchial Epithelial Cell-Cytokine Interactions in Airway Inflammation. *J Investig Med.* 43: 241-249 (1995).
- (12) Paulsson M. Basement membrane proteins: structure, assembly and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 93-127 (1992).
- (13) McDowell EM, Beals TF. Biopsy pathology of the bronchi. Philadelphia: WB Saunders Company (1987).
- (14) Rennhard I. Stephen et al. Airway Epithelial Cells: Functional Roles in Airway Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 27-30 (1994).
- (15) Gumbiner B. Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 253: 749-758 (1987).
- (16) Widdicombe JH. Ion transport by airway epithelia. *The Lung* 1: 263-267 (1991).
- (17) Söderberg M., S. Hellström, T. Sandström, R. Lundgren, A. Bergh. Structural characterisation of bronchial mucosal biopsies from healthy volunteers: a light and electron microscopical study. *Eur Respir J* 1: 883-889 (1988).
- (18) Laitinen LA, M. Heino, A. Laitinen, T. Kava, T. Haahtela. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis* 131: 599-606 (1985).
- (19) Jeffery P. K., A. Wardlaw, F. C. Nelson, J. V. Collins, A. B. Kay. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural quantification study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140: 1745-1753 (1989).
- (20) Woolcock A. J. and S. Ollerenshaw. Studies of Airway Inflammation in Asthma and Chronic Airflow Limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 103-105 (1994).

- (21) Laitinen A. L. and A. Laitinen. Modulation of Bronchial Inflammation. Coricosteroids and Other Therapeutical Agents. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 87-90 (1994).
- (22) Barnes P. J., New concepts in the patogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 83: 1013-1026 (1989).
- (23) Dunnill M. S.; G. R. Massarella, J. A. Anderson: A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis and in emphysema. *Thorax* 24: 176-179 (1969).
- (24) Jeffery P. K.; Comparative Morphology of the Airways in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 6-13 (1994).
- (25) Ollerenshaw S. L., D. Jarvis, A. Woolcock, C. Sullivan, T. Schreiber. Absence of immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in tissue from the lungs of patients with asthma. *N England J Med* 320: 1244-1248 (1989).
- (26) Ollerenshaw S. L., D. Jarvis, C. Sullivan, A. Woolcock. Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and non-asthmatics. *Eur Respir J* 4: 673-683 (1991).
- (27) A. Laitinen and L. A. Laitinen. Airway Morphology: Epithelium/Basement Membrane. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 14-17 (1994).
- (28) Rennard S. I., J. D. Beckmann, R. A. Robbins. Biology. In: Crystal R. G., J. B. West, P. J. Barnes, N. S. Cherniack, E. R. Weibel, editors. *The lung: scientific foundations*. New York: Raven Press, Ltd. : 157-167 (1991).
- (29) Holtzman M. J., H. Aizwa, J. A. Nadel, E. J. Goetzel. Selective generation of leukotrien B₄ by tracheal epithelial cells from dogs. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 1071-1076 (1983).
- (30) Eling T. E., R. M. Danilowicz, D. C. Henke, K. Sivarajah, J. R. Yankaskas, R. C. Boucher. Arachidonic acid metabolism by canine tracheal epithelial cells. Product formation and relationship to chloride secretion . *J Biol Chem* 261: 12841-12849 (1986).

- (31) Churchill L., F. H. Clinton, J. H. Resau, R. Bascom, W. C. Hubbard, D. Proud. Cyclooxygenase metabolism of endogenous arachidonic acid by cultured human tracheal epithelial cells. *Am Rev Respir Dis* 140: 449-459 (1989).
- (32) Nakamura H., H. Yoshimura, H. A. Jaffe, R. G. Crystal. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 19611-19617 (1991).
- (33) Takizawa H. et al. Interleukin 6/B-cell stimulatory factor-II is expressed and released by normal and transformed human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 596-602 (1992).
- (34) Bedard M., C. D. McClure, N. L. Schiller, C. Francoeur, A. Cantin, M. Denis. Release of interleukin-8, interleukin-6 and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 455-462 (1993).
- (35) Soloperto M., V. L. Mattoso, A. Fasoli, S. Mattoli. A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSF. *Am J Physiol* 260: L530-538 (1990).
- (36) Bellini A., E. Vittori, M. Marini, V. Ackermann, S. Mattoli. Intraepithelial dendritic cells and selective activation of Th2-like lymphocytes in patients with atopic asthma. *Chest* 103: 997-1005 (1993).
- (37) Sousa A. R., R. N. Poston, S. J. Lane, J. A. Nakhosteen, T. H. Lee. Detection of GM-CSF in asthmatic bronchial epithelium and decrease by inhaled corticosteroids. *Am Rev Respir Dis*. 147: 1557-1561 (1993).
- (38) Sapsford R. J., J. L. Devalia, A. E. McAulay, A. J. d'Ardenne, R. J. Davies. Expression of α 1-6 integrin cell-surface receptors in normal human bronchial biopsies (HBB) and cultured bronchial epithelial cells (HBE). *J Allergy Clin Immunol* 87: 303 (Abstract) (1991).

- (39) Wegner C. D., Gundel R. H., P. Reilly, N. Haynes, G. Letts, R. Rothlein. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247: 456-459 (1990).
- (40) Hamid Q., D. R. Springall, V. Riveros-Moreno, P. Chanez, P. Howarth, A. Redington, J. Bousquet, P. Godard, S. Holgate, J.M. Polak. Introduction of nitric oxide in asthma. *Lancet* 342: 1510-1513 (1993).
- (41) Barnes P. J. Cytokines as Mediators of Chronic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 42-49 (1994).
- (42) Butcher F. and E. W. Sutherland. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J Biol Chem* 237: 1244-1250 (1962).
- (43) Dent G., H. Magnussen and K. F. Rabe. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in the Human Lung. *Lung* 172: 129-146 (1994).
- (44) Conti M., S. L. C. Jin, L. Monaco, D. R. Repaske and J. V. Swinnen. Hormonal regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Endocrinol Rev* 12: 218-234 (1991).
- (45) Charbonneau H. Cyclic CMP-specific phosphodiesterase activity. In Beavo J. and M. D. Houslay (eds.). *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action* 267-296 (1990).
- (46) Stoop S. D., H. Charbonneau, J. A. Beavo. Direct photolabelling of the the cGMP-stimulated cyclic nucleotide-stimulated phosphodiesterase. *J Biol Chem* 264: 13718-13725 (1989).
- (47) Smith C. J., J. Krall, V. C. Manganiello, M. A. Movesian. Cytosolic and sarcoplasmic reticulum-associated low K_m , cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in mammalian myocardium. *Biochem Biophys Res Comm* 190: 516-521 (1993).
- (48) Sharma R. K., J. H. Wang. Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes by cyclic AMP-dependent protein kinase

and calmodulin-dependent protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2603-2607 (1985).

- (49) Torphy T. J., J. M. Stadel, M. Burman, L. B. Cieslinski, M. M. McLaughlin, J. R. White, G. P. Livi. Coexpression of human cAMP-specific phosphodiesterase activity and high affinity rolipram binding in yeast. *J Biol Chem* 267: 1798-1804 (1992).
- (50) Beavo J. A. Multiple phosphodiesterase isoenzymes: background, nomenclature and implications. In: *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action*, edited by J. Beavo and M. D. Houslay. Chichester, UK: Wiley 3-19 (1990).
- (51) Beavo J. A., M. Conti, R. J. Healslip. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* 46: 399-405 (1994).
- (52) Beavo J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms. *Physiol Rev* 75: 725-748 (1995).
- (53) Novack J. P., H. Charbonneau, J. K. Bentley, K. A. Walsh, J. A. Beavo. Sequence comparison of the 63-, 61-, and 59-kDa calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Biochemistry* 30: 7940-7947 (1991).
- (54) Sonnenburg W. K., D. Seger, J. A. Beavo. Molecular cloning of cDNA encoding the '61-kDa' calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Tissue specific expression of structurally related isoforms. *J Biol Chem* 268: 645-652 (1993).
- (55) Yan C., A. Z. Zhao, J. K. Bentley, K. Loughney, K. Ferguson, J. A. Beavo. A novel calmodulin-dependent phosphodiesterase that may mediate rapid olfactory signal termination. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995).
- (56) Hashimoto Y., R. K. Sharma, T. R. Soderling. Regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*. 264: 10884-10887 (1989).
- (57) Hagiwara M., T. Endo, H. Hidaka. Effects of Vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 33: 453-457 (1984).

- (58) Yang Q., M. Paskind, G. Bolger, W. J. Thompson, D. R. Repaske, L. S. Cutler, P. M. Epstein. A novel cGMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem Biophys Rev Comm* 205: 1850-1858 (1994).
- (59) Macfarland R. T., B. D. Zelus, J. A. Beavo. High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem* 266: 136-142 (1991).
- (60) Fischmeister R., H. C. Hartzell. Cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J Physiol Lond* 387: 453-472 (1987).
- (61) Mery P. F., R. Fischmeister. EHNA reverses the inhibitory effect of cGMP on cardiac L-type Ca current via PDE-II inhibition (Abstract) *FASEB J* 8: A82 (1994).
- (62) Macphee C. H., D. H. Reifsnyder, T. A. Moore, J. A. Beavo. Immunological identification of the major platelet low- K_m cAMP phosphodiesterase: probable target for anti-thrombotic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 6660-6663 (1986).
- (63) Maurice D. H., R. J. Haslam. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activation of adenylate cyclase: inhibition of cAMP breakdown by cGMP. *Mol Pharmacol* 37: 671-681 (1990).
- (64) Reeves M. L., P. J. England. Cardiac phosphodiesterases and the functional effects of selective inhibition. In: *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action*, edited by J. Beavo and M. D. Houslay. Chichester, UK: Wiley 299-316 (1990).
- (65) Macphee C. H., D. H. Reifsnyder, T. A. Moore, K. M. Lerea, J. A. Beavo. Phosphorylation results in activation of cAMP phosphodiesterase in human platelets. *J Biol Chem* 263: 10353-10358 (1988).
- (66) Rascon A., E. Degerman, M. Taira, E. Meacci, C. J. Smith, V. Manganiello, P. Belfrage, H. Tornqvist. Identification of the phosphorylation site in vitro for cAMP-dependent

- protein kinase on the rat adipocyte cGMP -inhibited cAMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 269: 11962-11966 (1994).
- (67) Kanya T., L. J. A. D. R. C. Wille. Biochemical studies on the mechanism of cardiotonic activity of MDL 17043. *J Cardiovasc Pharmacol* 4: 509-514 (1982).
- (68) Conti M., J. V. Swinnen. Structure and function of the rolipram-sensitive, low K_m cyclic AMP phosphodiesterase: a family of highly related enzymes. In Houslay M. and J. A. Beavo (eds.). *Molecular Pharmacology of Cell Regulation vol. 2: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action*, UK: Wiley 243-266 (1990).
- (69) Sette C., E. Vicini, M. Conti. The rat PDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269: 18271-18274 (1994).
- (70) Swinnen J. V., D. R. Joseph, M. Conti. The mRNA encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8197-8201 (1989).
- (71) Torphy T. J.; W. E. J. Dewolf, D. W. Green, G. P. Livi. Biochemical characteristics and cellular regulation of phosphodiesterase IV. *Agents Actions Suppl* 43: 51-71 (1993).
- (72) Torphy T. J., G. P. Livi, J. M. Balcarek, J. R. White, F. H. Chilton, B. J. Undem. Therapeutic potential of isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors in the treatment of asthma. *Adv second messenger Phosphoprotein Res* 25: 289-305 (1992).
- (73) Teixeira M. M., A. G. Rossi, T. J. Williams, G. W. Hellewell. Effects of phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on cutaneous inflammation in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 112: 332-340 (1994).
- (74) Thomas M. K., S. H. Francis, S. J. Beebe, T. W. Gettys, J. D. Corbin. Partial mapping of cyclic nucleotide sites and studies of regulatory mechanisms of phosphodiesterases using cyclic nucleotide analogues. *Adv second messenger Phosphoprotein Res* 25: 45-53 (1992).

- (75) Wilkins M. R., S. L. Settle, P. Needleman. Augmentation of the natriuretic activity of exogenous and endogenous atriopeptin in rats by inhibition of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate degradation. *J Clin Invest.* 85: 1274-1279 (1990).
- (76) Clarke W. R., S. Uezono, A. Chambers, P. Doepfner. The type-III phosphodiesterase inhibitor milrinone and type-V PDE inhibitor dipyridamole individually and synergistically reduce elevated pulmonary vascular resistance. *Pulm Pharmacol* 7:81-89 (1994).
- (77) Gillespie P. G., J. A. Beavo. Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyridamole and M&B 22,948. *Mol Pharmacol* 36: 773-781 (1989).
- (78) Michael T., T. J. Bloom, T. Martins, K. Loughney, K. Fergusson, M. Riggs, L. Rodgers, J. A. Beavo, M. Wigler. Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 12925-12932 (1993).
- (79) Lagnado L., D. Baylor. Signal flow in visual transduction. *Neuron* 8: 995-1002 (1992).
- (80) Gal A., U. Orth, W. Baehr, E. Schwinger, T. Rosenberg. Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit in autosomal dominant stationary night blindness. *Nature Genet* 7: 64-68 (1994).
- (81) Bloom T. J., J. A. Beavo. Identification of type VII PDE in HUT78 T-lymphocyte cells (Abstract). *FASEB J* 8: A372 (1994).
- (82) Ward A. J. M., M. McKenniff, J. M. Evans, C. P. Page, J. F. Costello. Theophylline - an immunomodulatory role in asthma? *Am Rev Respir Disease* 147: 518-523 (1993).
- (83) Bauer A. C., U. Schwabe. An improved assay of cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterases with QAE-Sephadex columns. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 311: 193-198 (1980).

- (84) Bloom T. J., J. A. Beavo. Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14188-14192 (1996).
- (85) Rousseau E., J. Gagnon, C. Lugnier. Biochemical and pharmacological characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase in airway epithelium. *Mol Cell Biochem* 140: 171-175 (1994).
- (86) Rabe K. F., H. Tenor, G. Dent, C. Schudt, S. Liebig, H. Magnussen. Phosphodiesterase isoenzymes modulating inherent tone in human airways: identification and characterisation. *Am J Physiol* 264: L458-L464 (1993).
- (87) Ichimura M., H. Kase. A new cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme expressed in the T-lymphocyte cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 985-990 (1993).
- (88) Fuhrmann M., H.-U. Jahn, J. Seybold, C. Neurohr, P. J. Barnes, S. Hippenstiel, H. J. Kraemer, N. Suttorp. Identification and function of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in airway epithelial cells. *Am J Respir Mol Cell Biol* 20: 292-302 (1999).
- (89) Kelley T. J., L. Al-Nakash, C. U. Cotton, M. L. Drumm. Activation of Endogenous $\Delta F508$ Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Phosphodiesterase Inhibition. *J Clin Invest* 98: 513-520 (1996).
- (90) Kelley T. J., L. Al-Nakash, M. L. Drumm. CFTR-mediated Chloride Permeability Is Regulated by Type III Phosphodiesterases in Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 657-664 (1995).
- (91) Wagner U., D. Bredenbroker, H. C. Fehmann, F. Schwarz, C. Schudt, P. von Wichert. Effects of selective and non-selective phosphodiesterase inhibitors on tracheal mucus secretion in the rat. *Eur J Pharmacol* 298 (3): 265-270 (1996).
- (92) Reinhardt R. R., E. Chin, J. Zhou, M. Taira, T. Murata, V. C. Manganiello, C. A. Bondy. Distinctive Anatomical Patterns of Gene Expression for cGMP-inhibited Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *J Clin Invest* 95: 1528-1538 (1995).

- (93) Kauffman R. F., B. G. Utterback, D. W. Robertson. LY 195115: a potent selective inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase located in the sarcoplasmatic reticulum. *Mol Pharmacol* 30: 609-616 (1987).
- (94) Rabe K. F., H. Tenor. S. M. Spaethe, G. Dent, C. Schudt, H. Magnussen, S. R. White. Identification of the PDE isoenzymes in Human Bronchial Epithelial Cells and the Effect of PDE Inhibition on PGE₂ Secretion. *Am J Respir Crit Care Med* 149: A986 (1994).
- (95) Robichaud A., L. C. Wright, J. Seybold, I. Adcock, P. J. Barnes. Cyclic nucleotide phosphodiesterase profile in human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 153: A727 (1996).
- (96) Heasley L. H., L. L. Brunton. Prostaglandin A₁ Metabolism and Inhibition of cyclic AMP Extrusion by Avion Erythrocytes. *J Biol Chem* 260: 11514-11519 (1985).
- (97) Geary C. A., M. F. Goy, R. C. Boucher. Synthesis and vectorial export of cGMP in airway epithelium: expression of soluble and CNP-specific guanylate cyclases. *Am J Physiol* 265: L598-L605 (1993).
- (98) L. L. Brunton, L. E. Heasley. cAMP Export and Its Regulation by Prostaglandin A₁. *Methods In Enzymology* 159: 83-93 (1988).
- (99) Woods M., M. D. Houslay. Desensitization of atriopeptin stimulated accumulation and extrusion of cyclic GMP from a kidney epithelial cell line (MDCK). *Biochem Pharmacol* 41: 385-394 (1991).
- (100) Hamet P., S. C. Pang, J. Tremblay. Atrial natriuretic factor-induced egression of cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Biol Chem* 264: 12364-12369 (1989).
- (101) Kübler D., W. Pyerin, O. Bill, A. Hotz, J. Sonka, V. Kinzel. Evidence for Ecto-protein Kinase Activity That Phosphorylates Kemptide in a Cyclic AMP-dependent Mode. *J Biol Chem* 264: 14549-14555 (1989).

- (102) Sorbera L. A., M. Morad. Modulation of cardiac sodium channels by cAMP receptors on the myocyte surface. *Science* 253: 1286-1289 (1991).
- (103) Paulmichl M., Y. Li, K. Wickman, M. Ackerman, E. Peralta, D. Clapham. New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356: 238-241 (1992).
- (104) Flo K., M. Hansen, A. Orbo, K. E. Kjorstad, J. M. Maltau, G. Sager. Effect of probenidol, verapamil and progesterone on the concentration-dependent and temperature-sensitive human erythrocyte uptake and export of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP). *Scand J Clin Lab Invest* 55: 715-721 (1995).
- (105) Barber R., R. W. Butcher. The egress of cyclic AMP from metazoan cells. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 15: 119-138 (1983).
- (106) Tsuji A., T. Terasaki, I. Tamai, K. Takeda. In Vivo Evidence for Carrier-mediated Uptake of β -Lactam Antibiotics through Organic Anion Transport Systems in Rat Kidney and Liver. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 315-320 (1990).
- (107) Norling L. L., C. A. Vaughan, R. L. Chevalier. Maturation of cGMP response to ANP by isolated glomeruli. *Am J Physiol* 262: F138- F143 (1992).
- (108) Moore J. E., R. F. Abercrombie. Calcium chelators enhance ^{45}Ca accumulation in permeabilized synaptosomes and in microsomes. *Am J Physiol* 270: c628-c635 (1996).
- (109) Harris M. N., A. K. Daborn, J. P. O'Dwyer. Milrinone and the pulmonary vascular system. *Eur J Anaesthesiol* 5 (Suppl.): 27-30 (1992).
- (110) Suttrop N., P. Ehreiser, S. Hippenstiel, M. Krüll, H. Tenor, C. Schudt. Hyper-permeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. *Lung* 174: 181-194 (1996).

- (111) Barnard J. W., A. F. Seibert, V. R. Prasad, D. G. Smart, S. J. Strada, A. E. Taylor, W. J. Thompson: Reversal of pulmonary capillary ischemia-reperfusion injury by rolipram, a cAMP phosphodiesterase inhibitor. *J Appl Physiol* 77: 774-781 (1994).
- (112) Suttorp N., S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krüll, J. Seybold. Phosphodiesterasen-inhibition und pulmonale Strombahn - ein neuer Therapieansatz? *Atem.-Lungenkrkh.* 22: 560-566 (1996).
- (113) Pepke-Zaba J., T. W. Higgenbottam, A. T. Dinh-Xuan, D. Dtone, J. Wallwork. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338: 1173-1174 (1991).
- (114) Ichinose F., C. Adrie, W. E. Hurford, W. M. Zapol: Prolonged pulmonary vasodilator action of inhaled nitric oxide by zaprinast in awake lambs. *J Appl Physiol* 78: 1288-1295 (1995).
- (115) Thusu K. G., F. C. Morin, J. A. Russell, R. H. Steinhorn: The cGMP phosphodiesterase inhibitor zaprinast enhances the effect of nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1605-1610 (1995).
- (116) Suttorp N., U. Weber, T. Welsch, C. Schudt. Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest.* 97: 1421-1428 (1993).
- (117) Suttorp N., S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krüll, T. Podzuweit: Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol.* 270: C778-785 (1996).
- (118) Holtzman M. J. Arachidonic Acid Metabolism In Airway Epithelial Cells. *Annu Rev Physiol.* 54: 303-29 (1992).
- (119) Dunn O. J., V. A. Clark. *Applied Statistics: Analysis of Variance and Regression.* New York: Wiley (1974).

- (120) Klockmann M. T. U., H. U. Jahn, S. Hippenstiel, H. J. Krämer, N. Suttorp: Interaction of Human Neutrophils with Airway Epithelial Cells: Reduction of Leukotriene B₄ Generation by Epithelial Cell Derived Prostaglandin E₂. *J Cell Physiol.* 175: 268-275 (1998).
- (121) Harbinson P. L., D. MacLeod, R. Hawksworth, S. O'Toole, P. J. Sullivan, P. Heath, S. Kilfeather, C. P. Page, J. Costello, S. T. Holgate, T. H. Lee: The effect of a novel orally active selective PDE4 isoenzyme inhibitor (CDP840) on allergen-induced responses in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 10(5): 1008-14 (1997).
- (122) Gilbert M. D., R. E. Hershberger, R. J. Wiechmann, A. M. Movesian, M. R. Bristow: Pharmacologic and Hemodynamic Effects of Combined β -Agonist Stimulation and Phosphodiesterase Inhibition in the Failing Human Heart. *CHEST* 108: 1524-32 (1995).
- (123) Vemulapalli S., R. W. Watkins, M. Chintala, H. Davis, H. S. Ahn, A. Fawzi, D. Tulshian, P. Chiu, M. Chatterjee, C. C. Lin, E. J. Sybertz: Antiplatelet and antiproliferative effects of SCH 51866, a novel type 1 and type 5 phosphodiesterase inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 28(6): 862-9 (1996).
- (124) Boolell M., S. Gepi-Attee, J. C. Gingell, M. J. Allen: Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Pharmacol* 78(2): 256-61 (1996).
- (125) Reiss T. F., P. Chervinsky, R. J. Dockhorn, S. Shingo, B. Seidenberg, T. B. Edwards: Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: A multicenter, randomized, double-blind trial. *Archives of Internal Medicine* 158(11): 1213-1220 (1998).
- (126) Aharony D. : Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Crit Care Med* 157(6) Suppl. S: S214-S219 (1998).
- (127) Alonso L. M., A. Cortes, M. G. Barrutia, T. Romo, A. Varas, A. G. Zapata. Bronchial epithelium associated to lymphoid tissue does not selectively express vimentin. *Histology and Histopathology* 12(4): 931-935 (1997).

- (128) Goulet F., L. P. Boulet, J. Chakir, N. Tremblay, J. Dube, M. Laviolette, M. Boutet, W. Xu, L. Germain, F. A. Auger. Morphologic and functional properties of bronchial cells isolated from normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15(3): 312-318 (1996).
- (129) Grealy M., M. A. Glynn, J. M. Sreenan: Cyclic AMP and cyclic GMP concentrations in, and efflux from, preimplantation cattle embryos. *Anim Reprod Sci* 48(2-4): 175-85 (1997).
- (130) Wu X. B., B. Brune, F. Von Appen, V. Ullrich: Efflux of cyclic GMP from activated human platelets. *Mol Pharmacol* 43(4): 564-8 (1993).
- (131) Murad F. : The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res* 49: 239-48 (1994).
- (132) Suttorp N., U. Weber, T. Welsch, C. Schudt: Role of Phosphodiesterases in the Regulation of Endothelial Permeability In Vitro. *J Clin Invest* 91:1421-1428 (1993).
- (133) Soderling S. H., S. J. Bayuga, J. A. Beavo: Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95(15): 8991-8996 (1998).
- (134) OlszewskaPazdrak B., A. Casola, T. Saito, R. Alam, S. E. Crowe, F. Mei, P. L. Ogra, R. P. Garofalo: Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 alpha by lower S. airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *Journal T. of Virology* 72(6): 4756-4764 (1998).
- (135) Berkman N., V. L. Krishnan, T. Gilbey, R. Newton, B. O'Connor, P. J. Barnes, K. F. Chung: Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. *Am J Resp Crit Car Med* 154(6): 1804-1811 (1996).

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Suttorp möchte ich für die Überlassung des Themas, die anregende Kritik und wertvolle Unterstützung danken. Ohne die manchmal etwas rauhe, aber immer sehr verlässliche Art und Weise, mit der er sich der Thematik in zahlreichen Einzel- und Laborbesprechungen angenommen hat, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dipl. Biologe Martin Fuhrmann und Herrn Dipl. Biologe Hans-Ulrich Jahn danke ich zusätzlich zu den vielen praktischen Hinweisen während der Durchführung der Experimente insbesondere für die freundschaftliche und angenehme Atmosphäre im Laboralltag.

Frau Dipl. Ing. Susanne Tannert-Otto möchte ich für ihre schier unendliche Geduld danken, mit der sie meinen mangelnden Ordnungssinn ertragen hat und trotzdem immer eine kompetente und hilfsbereite Ansprechpartnerin geblieben ist.

Mein besonderer Dank gilt Frau Bettina Ruf. Ohne ihre liebevolle Unterstützung und Einfühlbarkeit wäre mir insbesondere die experimentelle Phase dieser Arbeit sehr viel schwieriger gefallen und sicher nicht in so positiver Erinnerung geblieben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Herren Jochen Bühner, Andreas Ikemann und Dirk Vollmann bedanken. Trotz mancher Reibungspunkte im täglichen Zusammenleben bzw. während der gemeinsamen Arbeit im Labor haben sie mich davor bewahrt, den Blick für die wesentlichen Dinge des Lebens zu verlieren und meine Studienzeit entscheidend bereichert.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Claus Neurohr
Geburtsdatum und -ort	08.10.1971 in Quierschied/ Saar
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

09/1977 - 06/1981	Albert-Weisgerber-Grundschule St. Ingbert
08/1981 - 05/1990	Staatliches Leibniz-Gymnasium St. Ingbert
	Erlangung der Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

07/1990 - 06/1991	4./ Fallschirmjägerbataillon 262 Merzig „Auf der Ell“
-------------------	---

Hochschulbildung

11/1991 - 02/1992	Wirtschaftsingenieurwesen an der Universität Kaiserslautern
04/1992 - 11/1998	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
18.11.1998	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung